

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

SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE CACHARA
(*Pseudoplatystoma reticulatum*) COM O PROBIÓTICO
Bacillus subtilis

Acadêmica: Tatiane Auxiliadora Ribeiro Rodrigues

Bióloga

Aquidauana-MS
Junho/2016

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

SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE CACHARA
(*Pseudoplatystoma reticulatum*) COM O PROBIÓTICO
Bacillus subtilis

Acadêmica: Tatiane Auxiliadora Ribeiro Rodrigues
Orientadora: Dra. Cristiane F. 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
Junho/2016

R617s Rodrigues, Tatiane Auxiliadora Ribeiro Rodrigues

Suplementação da dieta de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) com o probiótico *Bacillus subtilis* / Tatiane Auxiliadora Ribeiro Rodrigues. Aquidauana, MS: UEMS, 2016.

67p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia –
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Meldau de Campos
Amaral.

1.Sistema imune de peixes 2.Hematologia 3.Probiótico
I.Título. CDD 23.ed. 639.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
PRODUÇÃO ANIMAL NO CERRADO-PANTANAL



TATIANE AUXILIADORA RIBEIRO RODRIGUES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/06/2016.

Dra. Cristiane de Fátima Meldau Campos Amaral
Orientador

Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Dr. Jayme Aparecido Povh

“Sim, peça sabedoria e grite pedindo entendimento. Procure essas coisas, como se procurasse prata ou um tesouro escondido”.

Provérbios 2: 3 e 4.

Com amor dedico:

Ao meu querido Deus pela sua força, proteção e
inspiração.

Em memória do meu amado avô José Alves Ribeiro, pelo
seu amor, ensinamentos e incentivos que continuam
vivos em minha memória e no meu coração.

Em memória do meu amado primo Michel Lorã Ribeiro
Amaral pelo amor manifestado a todos que o rodeavam
e pelo seu entusiasmo em tudo o que fez em vida
durante 25 anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos cuidados paternos.

Ao meu pai Jorge Bento Rodrigues Filho, pelo seu incentivo e participação no experimento, a sua ajuda foi importantíssima para execução do projeto. A minha mãe Eny Cueller e meus irmãos Alan Bruno e Jonyffer Fernando, pelo amor e parceria no decorrer do mestrado e de toda minha vida.

Minha avó Matilde pelas orações, amor e preocupação com esta neta.

Aos meus tios, tias e primos: Maisa Cueller, Sebastião Amaral, Paulo Bruno, Cristiane Sabadin, Erotilde Camargo, Edemilson Camargo, Luiza Fernanda, Vitor José, Michel Lorã, por ajudar, participar e apoiar meus projetos de vida pessoal e profissional, agradeço por tudo que já fizeram na minha vida, vocês são especiais.

Ao meu namorado André Honorato Rodrigues, pelo carinho, parceria, amizade, apoio nos momentos difíceis, a sua presença tornou esses dias mais felizes.

A minha querida orientadora Cristiane Meldau pela oportunidade de trabalharmos juntas e pelo aprendizado durante todo esse período na UEMS.

A Pamela Thaynara Veiga, um grande presente conquistado nesse mestrado foi a sua amizade e a troca de experiências que muito me ajudaram a executar o meu projeto.

A Cleojosi pela paciência, ensinamentos, ajuda, incentivo, conselhos e amizade, obrigada por me acolher no laboratório e me auxiliar.

Aos alunos de graduação Evelyn, Rubia, Nayara, foi uma grata surpresa encontrar alunos dedicados e talentosos.

Aos demais componentes do laboratório Leonardo, Wesley, Fúlvia, agradeço pela ajuda desejo a vocês sucesso.

Aos amigos queridos de Aquidauana que se tornaram minha família nesta cidade Paulinho Britto, Nayara Brito, Ingrid, Rafael B.V., Francielle, Dona Isabel e Julinha, vocês me acolheram e fizeram da minha vida longe de casa mais feliz.

Agradeço o Profº. Drº Carlos Eurico dos Santos Fernandes e o doutorando Robson Andrade da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por abrir as portas do laboratório, pelo auxílio de material e por ceder um pouco do tempo de vocês para ensinar e compartilhar seus conhecimentos, foi enriquecedor os momentos passados junto a vocês.

Ao Sr. Juarez e o Douglas, pela troca de experiência e ajuda no setor da piscicultura.

SUMÁRIO

9

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Sistema Imune de Peixes	2
2.3. Probióticos	10
2.4 <i>Bacillus subtilis</i>	12
2.5 Cachara (<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>)	14
3. OBJETIVO.....	16
3.1 Objetivos específicos	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2 – ARTIGO.....	29
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
RESULTADO.....	37
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO	47
RESUMO	47
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 3 – ARTIGO.....	56
ABSTRACT:.....	57
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAIS E MÉTODOS	58
RESULTADO E DISCUSSÃO	60
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Composição da ração comercial utilizada no experimento	33
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do peso inicial (PI), peso (PF), ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (S) de juvenis <i>P. reticulatum</i> suplementados <i>B.subtilis</i>	37
Tabela 3. Eritograma . Valores médios e desvio padrão para hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb), hemácias (RBC), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (VCM) e glicose (G) de juvenis de <i>P. reticulatum</i> suplementados com <i>B. subtilis</i>	38
Tabela 4. Valores relativos (%) das contagens diferenciais de leucócitos do sangue de juvenis de <i>P. reticulatum</i> alimentados com dietas suplementadas com <i>Bacillus subtilis</i> durante 30 dias.....	38
Tabela 5. Valores médios e desvio padrão das contagens diferenciais de leucócitos do sangue de juvenis de <i>P. reticulatum</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis do probiótico <i>Bacillus subtilis</i> durante 30 dias.....	39
Tabela 6 Valores médios absolutos e desvio padrão da contagem total de leucócitos e trombócitos do sangue de juvenis de <i>P. reticulatum</i> alimentados com dietas contendo diferentes níveis do probiótico <i>Bacillus subtilis</i> durante 30 dias.....	39
Tabela 7. Variáveis morfométricas do intestino de juvenis de <i>P. reticulatum</i> alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão do probiótico <i>Bacillus subtilis</i> durante 30 dias.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de defesa imunológica de peixes. Fonte : Patricia O. Maciel (2013).....	3
Figura 2. Parede intestinal de <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> : (A) altura das vilosidades; (B) altura total das vilosidades; (C) largura das vilosidades; (D) espessura do epitélio das vilosidades, (E) espessura da camada muscular e (F) células caliciformes.	36
Figura 3. Parede intestinal de <i>P. reticulatum</i> de fora para dentro: (A) serosa, (B) camada muscular, (C) submucosa, (D) mucosa, (E) Lamina própria e (F) área apical do vilo com células caliciformes.	
Figura 1-a. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier por níveis de inclusão do probiótico <i>B. subtilis</i> pós – desafio experimental.....	61
Figura 2-b. Probabilidade de sobrevivência e porcentagem de ocorrência do evento morte pós- desafio bacteriano nos tempos de 24 e 48 horas.	64

RESUMO

Este trabalho avaliou os efeitos da suplementação com o probiótico *Bacillus subtilis* na dieta de juvenis *Pseudoplatystoma reticulatum* na fase de treinamento alimentar. Após trinta dias de suplementação foram avaliados o desempenho produtivo, as respostas hematológicas, fisiológicas, histológicas e sobrevivência pós-desafio bacteriano (*Aeromonas hydrophila*) dos juvenis de cachara. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos, incluindo o controle (isento de probiótico) e mais quatro níveis de inclusão do probiótico *B. subtilis* (10, 20, 30 e 40 g/kg⁻¹ x 10⁹UFC kg⁻¹) e quatro repetições com cinquenta exemplares de juvenis de *P. reticulatum*, por repetição, com peso inicial de 9,7± 1,07g. A suplementação probiótica não interferiu no ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, sobrevivência e nos resultados hematológicos. O grupo suplementado com a dieta contendo 30 g x 10⁹ UFC/Kg⁻¹ de *B. subtilis* apresentou maior comprimento de vilosidades do intestino em relação aos outros tratamentos; os grupos suplementados com o probiótico apresentaram um número superior de células caliciformes em relação ao grupo controle isento de probiótico. No final desse período, ocorreu a segunda etapa, foram testados dois grupos experimentais desafiados com as concentrações 0,6 x 10⁶ e 0,9 x 10⁶ UFC (Unidade formadora de Colônia) *A. hydrophila* cada grupo dividido em cinco tratamentos níveis de inclusão do probiótico na alimentação: controle (n = 20), 10 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20), 20 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n= 20), 30 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20); 40 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20). A taxa de sobrevivência foi monitorada durante 15 dias. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa de sobrevivência entre os grupos suplementados com *Bacillus subtilis* e o grupo controle, a inclusão do probiótico não teve efeito benéfico aos juvenis *P. reticulatum* na fase de treinamento alimentar.

Palavras-Chave: *Bacillus subtilis*, hematologia, histologia, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudoplatystoma reticulatum*.

ABSTRACT

This work evaluated the effects of supplementation with the probiotic *Bacillus subtilis* in the diet of juvenile *Pseudoplatystoma reticulatum* in feed training phase. After thirty days of supplementation were evaluated the productive performance, hematology, histology and resistance to infection by bacterial (*Aeromonas hydrophila*) of juveniles of *P. reticulatum*. The experimental design was completely randomized, with five treatments including control (probiotic-free) and four levels of inclusion of probiotic *Bacillus subtilis* (10, 20, 30 and 40 g x 10⁹ UFC kg⁻¹) and four replicates with 50 units of juvenile *P. reticulatum*, by repetition, fish with average weight 9,7 ± 1, 07 g. Probiotic supplementation did not interfere in the weight gain, feed conversion, specific growth rate, survival and the hematological results. The group supplemented with diet containing 30 g x 10⁹ UFC/Kg⁻¹ de *B. subtilis* higher length of intestinal villi in relation to other treatments. The groups supplemented with probiotics showed a higher number of Goblet cells compared to the control group free of probiotic. At the end of this period, there was a second step, two experimental groups were tested challenged with concentrations 0,6 x 10⁶ e 0,9 x 10⁶ UFC (Colony-forming Unit) *A. hydrophila* each group divided into five treatment levels of inclusion of probiotic in food: control (n = 20), 10 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20), 20 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n= 20), 30 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20); 40 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20). The survival rate was monitored during 15 days. The results showed that there was no significant difference in survival between groups supplemented with *Bacillus subtilis* and the control group, the inclusion of the probiotic did not have beneficial effect to juveniles *P. reticulatum* in food training phase.

KEY-WORDS: *Bacillus subtilis*, hematology, histology, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudoplatystoma reticulatum*

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.2 INTRODUÇÃO

A produção de pescado demonstra uma tendência de crescimento no cenário mundial, o Brasil é o segundo maior produtor de pescado do continente americano depois do Chile, as perspectivas futuras para aquicultura são boas, pois a produção deverá crescer em 32% até 2024, impulsionado pelo aumento da demanda doméstica e por políticas nacionais que incentive o crescimento sustentável do setor (FAO, 2015).

O sucesso das pisciculturas depende muito da implantação de boas práticas de manejo, pois a produção em larga escala desencadeia um estresse inevitável aos animais, deixando-os suscetíveis a doenças ocasionadas por patógenos (URBINATI e CARNEIRO, 2004). Muitas doenças que causam prejuízos são ocasionadas por agentes infecciosos, podendo tornar a atividade onerosa e pouco lucrativa para os piscicultores, devido à mortalidade excessiva durante os surtos de infecções e infestações (TAVECHIO, 2009).

Uma das alternativas para estagnar a proliferação desses patógenos (parasitos e bactérias) na piscicultura, é a administração de antibióticos. Porém o uso indiscriminado do antibiótico possui um alto risco, podendo resultar no aumento da resistência de certas cepas bacterianas comensais do intestino humano ou bactérias aquáticas e do próprio organismo dos peixes, capazes de transferir rapidamente para outras bactérias essas características, tanto por alterações no genoma existente quanto por transferência de material genético entre células, além dos impactos ambientais, devido à liberação de resíduos orgânicos e inorgânicos (GASTALHO, 2014).

Entretanto algumas alternativas como uso dos probióticos (bactérias benéficas) vem sendo incluído como estratégia para inibir ou minimizar o uso de antibióticos. De acordo com Vershuere et al. (2000) "Um probiótico é definido como um adjunto microbiano vivo que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, modificando o ambiente associados ao hospedeiro ou comunidade microbiana, assegurando uma melhor utilização do alimento ou

melhorar seu valor nutricional, através do reforço na resposta imune para a doença, ou melhorando a qualidade do seu ambiente circundante”.

Um dos probióticos amplamente utilizado na aquicultura é o *Bacillus* (SILVA et al., 2013). Bactérias do gênero *Bacillus*, possuem como característica a formação de esporos resistentes, permitindo uma maior viabilidade após o processamento de rações e altas taxas de sobrevivência após exposição ao ácido gástrico do estômago, tornando-se um potencial probiótico para a aquicultura (OGGIONI et al., 1998).

Pouco se sabe sobre o uso do *Bacillus* como probiótico suplementando a dieta de peixes nativos do Brasil, principalmente os bagres do gênero *Pseudoplatystoma*. A fase inicial desta espécie é considerada com uma etapa crítica para a produção de pescado, devido à alta taxa de mortalidades dos peixes, decorrente de doenças causadas por bacterioses e parasitoses (ISHIKAWA, 2012). Deve-se atenção redobrada para esse período, com dieta adequada, balanceada e manejo alimentar intenso.

Nessas premissas, entende-se que é fundamental o estabelecimento de informações referentes às bases fisiológicas, hematológicas e imunológicas de juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* suplementada com probiótico *Bacillus subtilis*, de modo a melhorar tanto a compreensão dos processos que governam sua produção, como as práticas de manejo alimentar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema Imune de Peixes

O sistema imunológico é um conjunto de mecanismos fisiológicos, componentes celulares e humorais que agem em defesa do organismo contra agentes estranhos (microorganismos, toxinas ou células malignas), respondendo a fatores endógenos ou componentes exógenos que estimulam todo esse sistema e trabalhando também para manter a homeostase interna dos animais (IGRAM, 1980; TAKAHASHI e URBINATI, 2014).

Os peixes possuem um complexo sistema imunológico que atua de forma eficiente na defesa do organismo contra infecções e limita a ação e

duração de processos infecciosos ou parasitários, diminuindo o máximo possível a quantidade de lesões residuais no organismo; e tudo isso ocorre devido aos mecanismos de defesa inespecíficos e específicos dos peixes (IWASHITA & MACIEL, 2013).

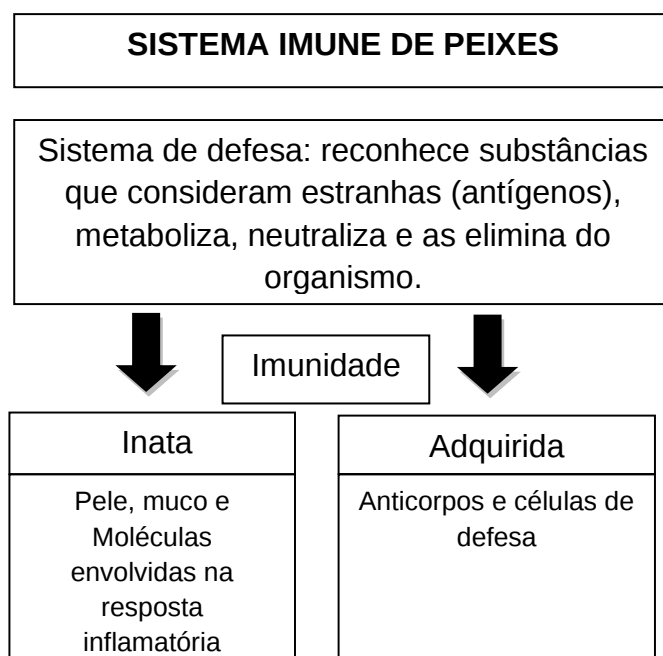


Figura Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.1. Mecanismo de defesa imunológica de peixes. Fonte : Patricia O. Maciel (2013)

O sistema imunológico está dividido em dois mecanismos de defesa, sistema inato e adquirido, estes por sua vez atuam de forma a complementar um ao outro; a resposta inata geralmente precede à adquirida, ativando e determinando a natureza da resposta específica e cooperando para manutenção da homeostase (FEARON, 1997).

A defesa inespecífica ou inata é de suma importância no combate de infecções e processos inflamatórios, é a primeira barreira de defesa do organismo, composta por pele, escamas, muco, alguns componentes biológicos (células fagocitárias presentes no sangue, células natural *Killer*, proteínas plasmáticas e o sistema complemento) (MAGNADÓTTIR, 2006).

A imunidade específica ou adquirida (lenta) é extremamente eficiente no combate a infecções (ocasionadas por vírus, bactérias e fungos) consiste em mecanismos capazes de reconhecer e combater organismos estranhos os

quais os peixes já foram expostos, envolvendo assim uma rede de células especializadas, proteínas, genes e mensagens bioquímicas que fornecem os meios necessários para o corpo reagir especificamente contra os antígenos, através da produção de anticorpos e células especializadas (URIBE, 2011).

Os peixes são carentes de tecidos mieloides, desta forma as células de defesa são produzidas principalmente por tecidos linfóides como o timo, baço e tecidos associados à mucosa e o rim sendo que estes são os maiores órgãos linfóides em teleósteos (SOUTO, 2015). Os órgãos envolvidos nos mecanismos da imunidade específica são: rim, baço, timo, fígado, intestino e o tecido associado à mucosa intestinal; órgãos estes produtores de células específicas de defesa os linfócitos (IWASHITA & MACIEL, 2013).

O rim apresenta a função de formação e maturação de células sanguíneas e de defesa; o rim dos peixes varia de acordo com a espécie e é dividido em duas porções: rim e rim cefálico (TAKAHASHI, 2014; COSTA, 2012). No entanto o rim cefálico é importante para produção e diferenciação de células do sistema de defesa, como os linfócitos (incluindo os linfócitos B), monócitos, macrófagos e granulócitos (MESEGUER et al., 1994; TORROBA & ZAPATA, 2003).

O baço está envolvido na formação de células de defesa e fagocitose de células velhas ou defeituosas, processo este denominado de hemocaterese, este órgão também encontramos os linfócitos e macrófagos, sendo que a maioria dos macrófagos está localizada nos centros melanomacrófagos e envolvidos na hemocaterese (PRESS et al., 1994)

O timo é responsável pela produção de células T e o fornecedor central de linfócitos do sangue, este órgão regula a interação de células linfóides e não-linfóides; em várias espécie de peixes essa glândula produz timosina, uma linfoprotéina que estimula a produção de linfócitos nos centros linfáticos (BOWDENI et al., 2005).

O fígado possui a função de produzir as proteínas do sistema complemento e proteínas, durante a fase aguda da resposta inflamatória há produções de compostos de defesa humoral inato de peixes (DALMO et al., 1997). Entre os componentes humorais inatos, estão os fatores inibidores do crescimento de bactérias, como a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos e as proteínas do sistema complemento;

estes fatores de inibição de crescimento bacteriano são importantes para evitar a disseminação da colônia e conseqüentes danos teciduais (TAKAHASHI, 2014).

Outro órgão essencial para sistema de defesa dos peixes é o intestino. O intestino conhecido como órgão de digestão e absorção assume um importante papel imunológico pelas suas ações de defesa contra perturbações provenientes do meio externo, sua função imune depende de três componentes: barreira intestinal, o sistema imune (tecido linfóide associado ao intestino, plasmócitos, linfócitos, imunoglobulinas) e a microbiota intestinal (COSTA & FONSECA, 2010).

No intestino, encontram-se as vilosidades ou vilos intestinais, que são evaginações da mucosa intestinal compostas pelo epitélio e lâmina própria, que se projetam na luz do intestino aumentando significativamente a área de superfície intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). São constituídos pelos enterócitos, células caliciformes, e células enteroendócrinas (BOLELI et al., 2002). A maioria dos peixes não apresenta criptas como nos vertebrados e a proliferação celular do epitélio do vilo ocorre pela multiplicação mitótica de células indiferenciadas na base dos vilos (JOBILING, 1995)

A mucosa do trato gastrointestinal associada aos tecidos linfóides, brânquias e a pele, produzem componentes do sistema inato de defesa, como lisozima, proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas (DALMO et al., 1997). Todas as células imunológicas necessárias para uma resposta imune local estão presentes na mucosa do intestino e as respostas imunitárias locais podem ser monitoradas após imunização intestinal (ROMBOUT, 2011).

O desenvolvimento da mucosa intestinal se dá pelo aumento no número das células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas), correspondendo ao aumento na altura e densidade dos vilos no epitélio intestinal (MAIORKA et al., 2002 e MELLO et al., 2013). Quanto mais íntegra a mucosa maior será o tamanho das vilosidades intestinal e maior a absorção de nutrientes, influenciando diretamente no desempenho e saúde dos peixes (GARCIA, 2008, SILVA et al., 2010 e JOBILING, 1995). Nesse contexto, vários estudos têm mostrado a importância das vilosidades intestinais e suas relações com a nutrição e saúde, não só de peixes, mas também de outros animais.

As células caliciformes presentes na mucosa intestinal são responsáveis pela produção de muco, constituído por glicoproteínas hidrofílicas, que protegem e lubrificam o revestimento do intestino (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). O muco secretado pelas células caliciformes dificulta a adesão de microrganismos patogênicos e também age como bactericida devido à presença de lisozima (NOGA, 1995), influenciando diretamente na saúde dos animais. O aumento no número de células caliciformes pode ser indicativo de um processo de agressão causado por infecção, toxinas, ou outros fatores (SCHWARZ et al., 2011).

Trabalhos na literatura corroboram a importância das células caliciformes na saúde dos animais. Juvenis de tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) alimentados com dietas contendo *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* como probióticos, apresentaram maior número de células caliciformes no epitélio intestinal (MELLO et al., 2013)

A camada muscular do intestino, formada pelas túnicas circular interna e a longitudinal externa, é responsável pelo movimento peristáltico contínuo do intestino delgado e define o volume e o tamanho do lúmen intestinal assim como a capacidade de contração do tubo digestório (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2012). Shiraishi et al. (2009) defendem a importância de se estudar os mecanismos de regulação do desenvolvimento da túnica muscular por ser parâmetro de boa saúde e nutrição dos animais. Foi observado por Kihara et al. (1995) a relação da fermentação de alimentos no intestino com o aumento da espessura da túnica muscular em *Pagrus major*, teleósteo marinho carnívoro criado em sistema de produção.

A microbiota intestinal é composta por organismos autóctones, com capacidade de colonizar a superfície do epitélio intestinal do hospedeiro, e espécies alóctones, composta por bactérias com presença transitória no trato gastrointestinal (RINGO & BIRKBECK, 1999). Estudos mostram que o trato gastrointestinal tem sido a principal rota de entrada de organismos patogênicos, sendo que a microbiota autóctone pode atuar como barreira à entrada desses agentes patogênicos (RINGO et al., 2003).

Outro fato relevante em organismos aquáticos é que estes possuem sua microbiota intestinal composta em sua maioria por microrganismos transeuntes, isto é, bactérias livres no lúmen intestinal, diferentemente dos animais

domésticos, onde a maioria dos componentes da biota microbiana está associada ao epitélio intestinal, sendo, portanto, permanentes. O ambiente em que vivem os peixes exerce influência de forma significativa na composição da população microbiana do trato gastrointestinal (SILVA et al., 2005). Estes animais não regulam a temperatura corporal e a associação de microrganismos no lúmen intestinal pode variar conforme a temperatura (LEITÃO & SILVEIRA, 1992).

Os tecidos linfóides dos peixes estão envolvidos na produção das células de defesa. A célula precursora pluripotente origina e renova todas as células sanguíneas pelo processo de hematopoiese, um processo constante que resulta em formação e maturação celular com conseqüente diferenciação em diversas células, tais como, eritrócitos, trombócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos dependendo do estímulo recebido (METCALF, 1995; EVANS, 1997).

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm a hemoglobina como pigmento respiratório, que tem por função transportar o oxigênio (O₂) no sangue, qualquer deficiência no eritrócito poderá prejudicar o aporte de O₂ nos tecidos. As alterações em sua estrutura estão altamente relacionadas à resposta dos organismos frente a processos anemiantes (RANZANI-PAIVA, SILVA SOUZA 2004, SATAKE, 2009). Segundo Clauss (2008) doenças em peixes causam anomalias em eritrócitos e conseqüentemente anemias, sendo *Aeromonas* spp. a causa mais comum de anemia hemolítica em peixes.

Os trombócitos nos peixes participam do processo de defesa do organismo (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os trombócitos podem possuir formas variadas nos peixes: elípticos, arredondados, ovais, fusiformes; com núcleo grande que acompanha o formato da célula (RANZANI-PAIVA et al. 2004). Além do seu papel de hemostasia, os trombócitos têm relevante participação no mecanismo de defesa orgânica, demonstrado pela sua presença nos processos de coagulação e inflamação, além de alguns autores sugerirem possível atividade fagocitária nos processos de infecção (TAVARES-DIAS, 2003; MARTINS et al., 2004).

Os leucócitos são células sanguíneas que participam dos mecanismos de defesa orgânica em peixes teleósteos, e estão subdivididos em dois grupos:

não granulares (linfócitos e monócitos), e leucócitos granulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e leucócitos granulares PAS positivo), e participam das respostas imunológicas de diferentes formas (FERNANDEZ, 2002).

Os linfócitos são leucócitos comuns e mais variados em teleósteos e elasmobrânquios saudáveis. Estas células são responsáveis pela resposta imune adaptativa humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (YOSHINAGA et al., 1996).

Os monócitos apresentam um papel importantíssimo na resposta imune, participando da produção de citocinas e da apresentação dos antígenos em teleósteos (VALLEJO, 1992; SHOEMAKER, 1997). Dentre as principais características destacam-se a capacidade de fagocitar material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (ELLIS, 1999).

Os neutrófilos são as células mais comuns entre as granulares e as primeiras envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). Estas células possuem a capacidade de fagocitose (FERNANDEZ, 2002) e atividade microbicida desencadeada durante o processo denominado "explosão respiratória", que consiste na conversão do oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio, como radicais livres do oxigênio (PLYZYCZ et al., 1989).

Os eosinófilos e basófilos (no tecido chamado de mastócito) se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. A função dessas células nos peixes não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que elas intervêm nos processos de inflamação crônica e na defesa celular, sendo mais comumente encontradas na corrente sanguínea quando há infestações por parasitos (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004). Os leucócitos granulares PAS-positivos (LG-PAS), anteriormente chamados de células granulocíticas especiais (CGE), porém pouco lembradas nos estudos hematológicos em peixes e não estão presentes em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) (RANZANI-PAIVA, 2004).

A variação nas características hematológicas em peixes depende da espécie, idade, sexo, alimentação e ambiente a que estão expostos (SERPUNIN & LIKHATCHYOVA, 1998; BARROS et al., 2002). Algumas variáveis sanguíneas são indicadores da resposta ao estresse. Portanto, constitui importante características a ser analisada quando os animais são expostos a produtos químicos (RANZANI-PAIVA et al., 1987; OMOREGIE, 1998), ao estresse (MARTINS et al., 2004), a infecções e a parasitos (TAVARES-DIAS et al., 2002).

As variações relativas à série vermelha são de grande valia na identificação de processos anemiantes (SERPUNIN & LIKHATCHYOVA, 1998), enquanto o leucograma pode ser empregado no diagnóstico de processos infecciosos (SERPUNIN & LIKHATCHYOVA, 1998). Tavares-Dias & Moraes (2004) reuniram informações hematológicas de diversas espécies de peixes que facilitam a comparação entre as espécies.

Com o crescente interesse pelo cultivo de peixes, cada vez mais informações sobre as características hematológicas são necessárias, uma vez que constituem valiosa contribuição para o diagnóstico de condições mórbidas, de estresse de manipulação ou do estado nutricional dos animais (TAVARES DIAS & FAUSTINO, 1998). Assim como estado de saúde dos organismos o que dependem muito do ambiente o qual estão inseridos, onde muitos podem conter altas concentrações de microorganismos patogênicos que são capazes de infectar os peixes quando encontram condições favoráveis a sua multiplicação, devido à tamanha complexidade e interação entre os mecanismos de defesa dos peixes, o seu sistema imunológico é diretamente afetado por fatores ambientais (estresse, manejo inadequado, qualidade da água, vírus, bactérias) e as condições nutricionais (TAVECHIO, 2009).

Dessa forma várias medidas profiláticas procuram melhorar a saúde e o bem-estar animal, principalmente em sistemas de criação intensiva de peixes, estratégias que visam modular a composição da microbiota intestinal para uma melhora no desempenho produtivo, no sistema imune e a resistência a doenças. Entre as estratégias mais promissoras está manipulação na dieta de microorganismos benéficos (probióticos) capazes de se multiplicar e colonizar o intestino do hospedeiro e executar inúmeros efeitos benéficos por meio da modulação de diferentes sistemas biológicos do hospedeiro. Entretanto são

necessárias avaliações para se conhecer o modo exato de ação dos probióticos no sistema imune de qualquer animal, incluindo peixes (NAYAK, 2010).

2.3. Probióticos

O trato gastrointestinal de todos os animais ao nascer é estéril e ligeiramente é colonizada pelas bactérias da mãe e do ambiente, esta ação de colonização da microbiota intestinal desempenha um fator essencial para o desenvolvimento do trato intestinal em termos de anatomia, fisiologia digestiva e imunologia (HOOPER, 2004).

Os benefícios de uma microbiota colonizada por bactérias benéficas são essenciais e indispensáveis para vida do animal, entretanto a mesma pode ser delicada e sofrer grandes interferências ocasionadas pela ingestão de drogas (sobretudo antibióticos), mudanças radicais na dieta ou estresse.

Quando microorganismos exógenos (patógenos) se instalam na microbiota intestinal, fica claro que funções essenciais deste meio estarão comprometidas e intervenções devem ser realizadas para compensar as falhas de funções essenciais. Diante destes fatos os probióticos podem ser classificados como bioterapias e ser utilizados em ambientes microbianos nas fases de adesão ao trato (colonização dos recém-nascidos) ou ser incorporados em outras fases da vida do animal após ocorrer uma perturbação radical (BOAVENTURA et al. 2012).

O probiótico é reconhecido como um suplemento alimentar que é constituído por bifidobactérias (bactérias benéficas) que melhoram o equilíbrio intestinal através da colonização do intestino, com a função de estimular o sistema imunológico e alterar o mecanismo microbiano (ANJO, 2004 e GIBSON & ROBERFROID, 1994). A definição mais aceita reconhecida internacionalmente é que: "...eles (probióticos) são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO, 2001; SANDERS, 2003).

Os probióticos apesar de serem microorganismos benéficos apresentam algumas características que os tornam um produto de boa qualidade e com potencial para substituição de antibióticos na aquicultura, são elas: a

capacidade de sobrevivência em condições adversas no trato gastrointestinal, como ação da bile e dos sucos digestivos (gástrico pancreático e entérico); adesão as células da mucosa intestinal; capacidade de colonização do trato; produz substâncias antimicrobianas capaz de resistir ao tempo entre a fabricação, comercialização, ingestão do produto, devendo atingir o intestino ainda vivo (HUTCHENSON, 1987; ANJO, 2004; AZEVEDO e BRAGA, 2012).

Outro fator positivo dos probióticos é o seu mecanismo de ação baseada na exclusão competitiva, no qual os microorganismos benéficos selecionados competem com as bactérias potencialmente prejudiciais pelo sítio de adesão da parede do trato digestivo, evitando assim a colonização por bactérias patogênicas e a competição por nutrientes (STEINER, 2009). Da mesma forma há um aumento da colonização da microflora normal por bactérias benéficas com a inibição da adesão de agentes patogênicos prejudiciais para o epitélio intestinal (McDONALD et al., 2010; CHO JH, 2011; YIRGA, 2015). Um estudo realizado por Daniels (2010) utilizando fase larval da Lagosta europeia (*Homarus gammarus* L.) suplementadas com o probiótico *Bacillus* spp. (SANOLIFE® - INVE Aquaculture, Belgium) e o prebiótico, MOS (BIO-MOS® - Alltech Inc., KY USA) demonstraram quantitativamente que na microbiota o nível de *Vibrio* spp. observado foi menor apenas na fase larval I da lagosta europeia sendo que os grupos tratados com o probiótico *Bacillus*, MOS + *Bacillus* reduziram os níveis de *Vibrio* spp., nos estágios III e IV da lagosta.

Os probióticos possuem outras propriedades benéficas, como a capacidade de produção de substâncias bactericidas pelos microorganismos probióticos estabelecidos no intestino, essas substâncias reduzem o pH intestinal a um nível que bactérias nocivas não podem tolerar, assim como estimulam a produção de peróxido de hidrogênio que inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas (McDONALD et al., 2010).

Existe ainda outro mecanismo de ação do probiótico que está sob investigação, e este está relacionado às suas influências no sistema imune, pois a sua ação dos microorganismos benéficos nas comunidades microbianas no trato gastrointestinal pode se apoiar na defesa do animal natural contra patógenos invasores por estimulação da resposta imunitária gastrointestinal; e isto pode ajudar o desenvolvimento do sistema imunitário através da estimulação da produção de anticorpos (YIRGA, 2015).

Diferente de outros organismos, probióticos modulam vários parâmetros hematológicos e imunológicos em teleósteos, interagindo com células imunitárias tais como células fagocíticas mononucleares (monócitos, macrófagos), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), podem aumentar o número de eritrócitos, granulócitos, macrófagos e linfócitos em diferentes espécies (IRIANTO, 2002; KUMAR, 2008).

Os testes realizados *in vitro* e *in vivo* com probióticos estimularam a proliferação de linfócitos B em peixes e a suplementação do probiótico na dieta elevou o nível de imunoglobulina (NAYAK, 2007; PANIGRAHI, 2004; AL-DOHAIL, 2009).

Exibindo efeitos positivos quanto a sua utilização na dieta de pescado as espécies mais utilizadas na aquicultura de microorganismos probióticos são: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johonsii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium* spp., *B. subtilis* e *B. toyoi*.; sendo assim estes probióticos podem ser utilizados na água ou incorporados na dieta dos peixes, com intuito de promover um melhor estado de saúde, um melhor desempenho zootécnico e da mesma forma evitando patógenos indesejáveis no organismo hospedeiro (FERREIRA et al., 2012).

Apesar de todos os benefícios expostos pelo uso do probiótico, os resultados observados ainda podem ser contraditórios e carecem de mais estudos científicos principalmente no que diz respeito à utilização de um modelo biológico de espécies nativas de peixes, e futuramente contribuir com a viabilização da incorporação desses produtos na alimentação dos peixes.

2.4 *Bacillus subtilis*

Bactérias do gênero *Bacillus* há mais de 50 anos têm sido utilizadas como probiótico, sendo que foi registrado na Itália em 1958 como um suplemento medicinal (CUTTING, 2011). No entanto o interesse da comunidade científica no gênero foi despertado somente nos últimos 15 anos (HONG et al, 2005; SANDERS et al.; 2003MAZZA, 1994). Das espécies que foram amplamente examinadas destacam-se estas: *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* e *B. licheniformis* (CUTTING, 2011).

A espécie *B. subtilis* têm como habitat natural o solo podendo ser encontrada no trato gastrointestinal dos peixes e como característica positiva uma incrível capacidade de ocupar eficientemente diferentes nichos (LANA FILHO, 2010). Estas bactérias são gram-positivas, aeróbicas, formadoras de esporos, atuam benéficamente sobre equilíbrio da microflora intestinal e por esta razão é utilizada no tratamento e prevenção de doenças intestinais (OGGIONI et al., 1998). O potencial patogênico de *B. subtilis* é geralmente descrito como fraca ou ausente (BOER, 2002).

Estudos estão sendo realizadas para verificar os benefícios e potenciais probióticos para a espécie *B. subtilis* no setor da aquicultura. Em estudo realizado com a carpa da Índia *Labeo rohita* (Ham.) foi avaliado o *B. subtilis* como potencial probiótico, após sua incorporação na dieta da carpa da Índia e foi observado que o grupo tratado com 1,5 g/kg 10^7 de probiótico *B. subtilis*, obteve maior índice de sobrevivência (87,5%), ganho de peso (35,5%), teor de hemoglobina (7,4% g /dL⁻¹), proteína total (2,37 g /dL⁻¹) e conteúdo de globulina (1,28 g /dL⁻¹); sugerindo assim como um produto com potencial para comercialização na aquicultura (KUMAR, 2006).

Zhao (2012) utilizou em sua pesquisa bactérias da espécie *B. subtilis*, isoladas do próprio intestino de pepinos do mar saudáveis (*Apostichopus japonicus*); e os resultados demonstraram que os grupos suplementados com *B. subtilis* T13 teve efeito significativo positivos sobre os parâmetros de crescimento específico, fagocitose, atividade oxidativa, síntese total de óxido nítrico e a mortalidade pós-desafio do grupo alimentado com *B. subtilis* T13 diminuiu.

Outro estudo envolvendo microorganismos probióticos da espécie *B. subtilis* foi realizado incorporando o mesmo em uma ração basal contendo farelo de soja para juvenis de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), Olmos et al.(2011) observaram melhoras no desempenho zootécnico, maior taxa de sobrevivência e maior índice de tolerância ao estresse. O mesmo comportamento foi verificado com relação à sobrevivência e crescimento de larvas de ostras (*Crassostrea corteziensis*) por Campa-Cordova et al. (2009).

São vários benefícios observados nos peixes após a utilização do probiótico *Bacillus*, por exemplo, aumento da resposta imune dos animais, maior sobrevivência frente alguns patógenos, reposição da microbiota após uso

de antibiótico e produção de substâncias antimicrobianas de amplo espectro (SUGITA et al., 1998; KUMAR, 2008; RAIDÁ et al., 2003; GREEN, et al., 1999).

Mais pesquisas necessitam ser realizados para explorar de forma mais abrangentes o potencial probiótico das cepas bacterianas de *B. subtilis*, principalmente utilizando espécies puras e nativas de peixes.

2.5 Cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*)

Na ordem dos Siluriformes encontramos a família dos Pimelodidae, constituída por 30 gêneros e 90 espécies (LITTMANN & LUNDDER, 2003) distribuída em diversas regiões da América do Sul.

Inserido na família Pimelodidae temos o gênero *Pseudoplatystoma* constituído por seis espécies de acordo com o estudo realizado por Buitrago–Suárez e Burr (2007): *P. fasciatum* (restrito à região das Guianas), *P. punctifer* (proveniente do *P. fasciatum* do rio Amazonas); *P. orinocoense* (proveniente do *P. fasciatum* da bacia do rio Orinoco); *P. magdaleniatum* (proveniente do *P. fasciatum* do rio Magdalena na Colômbia); *P. reticulatum* (proveniente do *P. fasciatum* dos rios Paraná e Amazonas). O *P. tigrinum*, originalmente da bacia Amazônica, foi dividido em duas espécies: o *P. tigrinum* restrito à bacia do rio Amazonas e o *P. metaense* originário do rio Orinoco e foi observado que o *P. coruscans* da Bacia do São Francisco é uma espécie irmã daquela encontrada na bacia da Prata.

A ordem Siluriformes a qual está inserido o *Pseudoplatystoma reticulatum*, possui peixes com ampla distribuição nas bacias hidrográficas da América do Sul, com particularidades morfológicas diferenciadas, o corpo é geralmente nu ou revestido por placas dérmicas, são conhecidos como peixes de couro, apresentam nadadeiras dorsais, peitorais, ventrais, anais e caudais raiadas, nadadeiras adiposas, têm barbilhões sensitivos presentes na mandíbula e maxila; apresentam hábitos geralmente associados às porções mais próximas do substrato (BRITSKI et. al. 1988, FERREIRA et. al. 1998, BAUMGATNER et. al. 2012).

Destacamos as características do *P. reticulatum* Eigenmann & Eigenmann 1889, nosso modelo biológico, popularmente conhecido como cachara, apresentam corpo acinzentado na região dorsal, com faixas pretas transversalmente alongadas e irregulares, o ventre esbranquiçado sem

manchas, nadadeiras esbranquiçadas com pequenas manchas e pintas pretas, corpo baixo e cabeça muito deprimida e perfil ventral reto, olho médio boca ampla e termina ou levemente subterminal (BAUMGARTNER et. al. 2012), peixe carnívoro de hábitos noturnos.

Peixes do gênero *Pseudoplatystoma* são excelentes para mercado, pois o surubim possui uma carne saborosa, macia de coloração clara, onde não encontramos espinhos em forma de “Y” em sua musculatura (HONORATO, 2014). O surubim também é atrativo para pesca esportiva e como peixe ornamental (CAMPOS, 2012).

Este grupo de peixes é apresentado no mercado principalmente pelo pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e o cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e pelo cruzamento das duas espécies (híbrido) *Pseudoplatystoma* ssp., não diferenciando quanto ao produto final (GONÇALVES, 2014).

Apesar de todas estas características promissoras, o hábito alimentar carnívoro e noturno tem como inconvenientes para a produção intensiva deste peixe a necessidade de treinamento alimentar e a exigência de altos teores de proteína bruta nas dietas comerciais, associados a alta taxa de mortalidade nas fases de larvas e juvenis, torna os custos onerosos para a produção (KUBITZA, 1995; LUZ et al., 2001).

Soma-se ao fato que a sobrevivência das larvas de surubim apresenta tendência de redução com o aumento da densidade de estocagem, associado ao canibalismo nas fases mais jovens e as doenças que podem ser ocasionadas pelo estado nutricional dos peixes, prejudicam muito a sua produção nas fases iniciais (CAMPAGNOLO e NUÑER 2006).

Fases iniciais estão constantemente expostas a inúmeros agentes patogênicos quando em sistema de criação. O conhecimento dessas doenças, bem como suas relações com o ambiente e o hospedeiro (peixe), são passos iniciais para o desenvolvimento de estratégias de controle e erradicação mais eficientes (ISHIKAWA et.al, 2011). Há uma carência de pesquisas voltadas para o domínio da criação e aumento da resistência da espécie de peixe *P. reticulatum* por meio da suplementação de bactérias probióticas em sua alimentação.

3. OBJETIVO

Avaliar o desempenho, hematologia, morfometria do intestino e resistência ao desafio bacteriano com *Aeromonas Hydrophila* de *Pseudoplatystoma reticulatum* submetidos a dieta com o probiótico *Bacillus subtilis*.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o ganho de peso, crescimento específico, conversão alimentar, sobrevivência.
- Avaliar os efeitos da suplementação da dieta de *P. reticulatum* com o probiótico *B. subtilis* na hematologia por meio dos parâmetros sanguíneos (série vermelha, índices hematimétricos, série branca e glicose) aos 30 dias,
- Avaliar o efeito a morfometria do intestino de juvenis de *P. reticulatum* suplementado com *B. subtilis* por meio da altura e espessura das vilosidades, espessura da mucosa e da submucosa, da lâmina própria, da camada muscular e a serosa, bem como quantificar o número de células caliciformes;
- Avaliar a resistência de juvenis de *P. reticulatum* suplementados com o *B. subtilis* posterior ao desafio bacteriano com *A. hydrophila*, por meio das avaliações da sobrevivência e de sinais clínicos de bacteriose durante 15 dias.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DOHAIL, M. A., HASHIM, R., ALIYU-PAIKO, M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. **Aquac Res** **40** :1642 e 1652. Ano de 2009.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular; J. Vasc. Br.** 2004, Vol. 3, Nº2.

AZEVEDO, R.V. e BRAGA, L.G.T. Use the probiotics in aquaculture. **INTHEC Open Science**, 2012. Disponível: <http://dx.doi.org/10.5772/50056>.

BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; KLEEMANN, G.K.; HISANO, H.; ROSA, G.J.M. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Orochromis niloticus*). **Ver. Bras. Zoot., Viçosa**, v.31, p. 2149-2156, 2002.

BAUER, A.J. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. **Neurogastroenterol Motility**, 20(1), p.81-90, 2008.

BAUMGARTNER, G; PAVANELLI C. S.; BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. Peixes do baixo Iguaçu [online]. **Maringá: Eduem**, pag. 101- 146. 2012. ISBN 978-85-7628-586-1. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>> Acesso 15 de setembro de 2015.

BOAVENTURA, C., UETANABARO, A., NICOLE, J., BRAGA, L.G., AZEVEDO, R. The Benefits of Probiotics in Human and Animal Nutrition. **INTECH Open Access Publisher**, 2012. ISBN 9535105213, 9789535105213.

BOER, A.S and DIDERICHSEN, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B.amyloliquefaciens*: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36 : 1- 4. 1991.

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.

BOLELI IC, 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; 2002. P. 75-96.

BRITSKI, H.A., SATO Y. & ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Maria: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco . **3ª Ed. Câmara dos Deputados/Codevasf, Brasília** 115p. 1988.

BOWDEN, T.J.; COOK, P.; ROMBOUT, J.H. Development and function of the thymus in teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p.413–27, 2005.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A., BURR, B.M., Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, V .1512, p.1-38, 2007.

CAMPOS, J. L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, 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 UFMS**, 335- 361. Ano de 2012.

CHO, J. H., ZHAO, P.Y., KIM, I. H. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs. **Journal of Animal and Veterinary Advances** ,2011; 10: 2127-2134.

CORDOVA, A.C. I, GONZALEZ, A.L, SUASTEGUI, J. M. et al. Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *crassostrea corteziensis* (Bivalvia: ostreidae). **Revista de biologia tropical**, v.59, n.1, p.183-191, 2009.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics – Review. **Food Microbiology Ed. 28**, ano 2011, pag. 214 e 220. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007.

DALMO, R. A., INGEBRIGTSEN, K., BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **J.Fish Dis.**, 20:241-273. 1997.

DANIELS, C. L. et al. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. **Aquaculture**, 2010 (304) 49–57. Doi:10.1016/j. aquaculture. 2010.03.018.

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

EVANS, A.E. Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria. **Dev.Comp. Immunol.**, 2001; 25:827-839.

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): células y órganos. **Revista Acua. Tic, Zaragoza**, n. 16, abr. 2002.

FERREIRA, A. H. C., ARARIPE M. N. B. A., MONTEIRO, C. A. B., LOPES, J. B., ARARIPE, H. G. A. Uso de probióticos na aquicultura – Revisão Artigo 176 - **REVISTA ELETRÔNICA NUTRITIME Volume 9** - Número 05 – p. 1965 – 1980 - Setembro/ Outubro 2012– ISSN 1983-9006.

FERREIRA, E. J. G., ZUANON, J. A. S. & SANTOS, G.M. Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará. **Edições IBAMA**, Brasília-DF, 1998.

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: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FONSECA, F. C. P.; COSTA, C. L. Influência da nutrição sobre o sistema imune intestinal. **CERES Nutrição e Saúde**; p. 163-174, 2010.

GARCIA, F. Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápia-do-nilo em tanques-rede. Tese (Aquicultura). Unesp. Jaboticabal, 2008.

GASTALHO, S., SILVA, da G. J, RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, vol.3, n.1, ano de 2014, pp. 29 - 45.

GIBSON, G.R., ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J.Nutr** 1995; 6:1401-12.

GONÇALVES, A. F. N. Desempenho produtivo e resposta fisiológica de juvenis de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) alimentados com diferentes níveis de proteína e carboidrato. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal)- Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Dracena/ Campus de Ilha Solteira, SP, 2014.

GREEN, D.H., WAKELEY, P.R., PAGE, E.A., BARNES, A., BACCIGALUPI, L., RICCA, E. & CUTTING, S. M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, ano de 1999, 65, 4288 – 4291.

HONG, H. A., DUC LE, H., CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiol. Rev.** 2005, (29) 813-835.

HONORATO, C. A., CANEPPELE, A., MATOSO, J. C., PRADO, M. R., SIQUEIRA, M. S., SOUZA, L. R. O. Caracterização física de filés de Surubim (*Pseudoplatystoma* sp.), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Pirarucu (*Arapaimas gigas*). **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 4, p. 237-242, out./dez. 2014.

HOOPER, L. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**, vol.12. nº 3, pp. 129 – 134, ISSN 0966 – 842X.

HUTCHENSON, D. Researcher lists characteristics of probiotics. **Feddstuffs** 1987, 14: 8 – 10.

INGRAM, G. A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - A review. Fisheries Society of the British Isles. **J. Fish Biol.** v. 16, 23-60; 1980.

IRIANTO, A., AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish. Dis.** Ano de 2002 ; 25: 333 - 42.

ISHIKAWA, M. M.; PÁDUA, S. B., SATAKE, F.; MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M. Identificação morfológica de organismos semelhantes à Anaplasmatidae em monócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 225-228, ano de 2011.

IWASHITA, M. K. P, MACIEL, P. O. Princípios básicos de sanidade de peixes – Capítulo 7. Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos/editores técnicos, Rodrigues, A. P. O. [et al.]. – Brasília, DF: **Embrapa**, 2013. p. 215.

JOBLING, M. Environmental biology of fishes. **Fish and Fisheries** Series 16. London: Chapman & Hall, 455p, 1995.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556p.

KIHARA, M., OHBA, K.; SAKATA, T. 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, 1995.

KUBITZA, F. Preparo de ra  es e estratégias de alimento no cultivo intensivo de peixes carn voros. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRICA O DE PEIXES E CRUSTACEOS**, 1995, Campos do Jordão. Anais. Campos do Jordão, 53-68.

KUMAR, et al. Effects of *B. subtilis* on growth and survival of *L. rohita*. **Aquaculture Research**, 2006, 37, 1215 – 1221. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01551.x.

KUMAR, R., MUKHERJEE, S. C., RANJAN, R., NAYAK, S. K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. **Fish Shellfish Immunol**, 2008; 24:168 - 72.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M. et al. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tr pica – Ciências Agrárias e Biológicas** V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

LEITÃO, M.F.M. & SILVEIRA, N. F. Influência da temperatura ambiental na natureza e potencial deteriorador da microbiota bacteriana de peixes em ambientes lacustres Tropicais. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 23(1), 85-96, 1992.

LUNDBERG, J. G. & LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: REIS, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, Jr., C. J. eds. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, 2003. p. 432-446.

LUZ, R. K. Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentadas com diferentes dietas. **Pesq. agropec. bras.**,

Brasília, v.42, n.1, p.65-72, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n1/09.pdf>>. Acesso 17 de setembro de 2015.

LUZ, R. K., SALARO, A. L., SOUTO, E. F., SAKABE, R. Desenvolvimento de alevinos de Trairao alimentados com dietas artificiais em tanques de criaçao. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2001; 30 (4), 1159 - 1163.

MAGNADÓTTIR, S. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology** ,2006; 20 (2) : 137 - 151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006.

MAIORKA, A. Efeito da idade da matriz e do agente trófico (glutamina) sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte na primeira semana. Tese (Zootecnia) Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2002.

MANNING, M. J. Fishes. In: TURNER, R. J. (Ed.). **Immunology**. Chichester: **John Wiley and Sons**, 1994. p. 69-100.

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

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as antidiarrhoeal microorganism. **Boll. Chim. Farm.** 1994, 133: 3-18.

McDONAL, P., EDWARDS, R. A., GREENHALGH, J. F. D., MORGAN, C. A., SINCLAIR, L. A. *et al.* Animal Nutrition. **7 th. edn. 2010**, Pearson Books.

MELLO, H. de; JULIETA, R.E. de M.; Niza, I.G.; Moraes, F. R. de; Ozório, R.O.A.; Shimada, M.T.; Engracia Filho, J.R.; Claudiano, G.S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(6),724-730, 2013.

MESEGUER, J., ESTEBAN, A. M., LOPEZ-RUIZ, A., BIELEK, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine

and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L. and carp: *Cyprinus carpio* L.). **The Anat.Rec.** 1994, 239:468-474.

METCALF, D. & NICOLA, N. A. The hematopoietic colony-stimulating factors: From biological to clinical applications. **New York, Cambridge University Press**, 1995.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology** V. 29, 2010 ; 2-14. doi:10.1016/j.fsi.2010.02.017.

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 Immunol** , 2007; 23:892 - 6.

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

OECD/FAO, "OECD-FAO Agricultural Outlook", OECD Agriculture Statistics (2015), (database). doi: <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>.

OGGIONI , M.R. *et al.* Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis* . **Journal of clinical microbiology** Jan. 1998, Vol. 36, No. 1 p. 325–326.

OLMOS, J.; L. OCHOA, PANIAGUA, J. M. *et al.* Functional Feed Assessment on *Litopenaeus vannamei* Using 100% Fish Meal Replacement by Soybean Meal, High Levels of Complex Carbohydrates and *Bacillus* Probiotic Strains. **Marine Drugs**, v.9, n.6, p.1119-1132, 2011.

OMOREGIE, E. Changes in the haematology of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Trewavas under the effect of crude oil. **Acta Hydrobiol, Krakow**, v.40, p. 287-292, 1998.

PANIGRAHI, A., KIRON, V., KOBAYASHI, T., PUANGKAEW, J., SATOH, S., SUGITA, H. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 2004; 102:379 – 88.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C. M.; GALVAN, I.; BAYNE, C. J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology, Oxford**, v. 13, n. 3, p. 217-224, 1989.

PRESS, C.M.C.L.; DANNEVIG, B.H., LANDSVERK, T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmon salar L.*). **Fish Shellfish Immunol.**, 1994; 4:79-93.

RAIDA, M. K., LARSEN, J. L., NILSEN, M. E. & BUCHMANN, K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BIOPLUS2B). **J. Fish Dis.** 2003; 26, 495–498.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; PEREZ LIZAMA, M. de los. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.; ISHIKAWA, C.M.; PORTELLA, M.C.; CELIBERTO, R.J. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio* ,infestado por *Argulus* dp. E após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2-tricloroetilo (Neguvon). **Bol. Ins. Pesca**, São Paulo, v.14, p. 83-92, 1987.

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

RINGO, E. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. **Aquaculture**, 39, 171–180, 2008.

RINGO, E.; OLSEN, R. E.; MAYHEW, T. M.; MYKLEBUST, R. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. **Aquaculture**, 227, 395-415, 2003.

ROMBOUT, J.H.W.M.; ABELLI, L.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G.; KIRON, V. Teleost intestinal immunology. **Fish Shellfish Immunol** 31, 616–626, 2011.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M. E., MORELLI, L., TOMPKINS, T. A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** 2003; (2) 101-110.

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*, 40, 2634-2640, 2011.

SERPUNIN, G.G.; LIKHATCHYOVA, O.A. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs, **Acta Vet.**, Budapest, v.67,p.339-345, 1998.

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

SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. **Tilapia Aquaculture**, [S.l.], v. 2, p. 671-680, 1997.

SILVA, E. F., SOARES, M. A., CALAZANS, N. F., VOGLEY, J. L., DO VALLE, B. C., SOARES, R. & PEIXOTO, S. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquacul. Res.** 2013, 44, 13-21.

SILVA, F.C.P.; BRITO, M.F.G.; FARIAS, L.M.; NICOLI J. R. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *Journal of Fish Biology*, 67,1686-1698, 2005.

SILVA, L.C.A.R.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M.; SCHAMBERr, C.R.; SANTOS, L.D.; VIDAL, L.V.O. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *Brazilian Journal of Animal Science*, 39(6), 1175-1179, 2010.

SOUTO, C. N., OLIVEIRA, M. D., CUNHA, J. M. S., PÁDUA, D. M. C., OLIVEIRA, S. L. Aspectos nutritivos relacionados a saúde de peixes. **REVISTA ELETRÔNICA NUTRITIME** – Artigo 302 Volume 12 - Número 02– p. 4030–4044- Março/Abril 2015. ISSN 1983-9006 www.nutritime.com.br

STEINER, T. Probiotics in Poultry and Pig Nutrition: Basics and Benefits. **The Poultry site**, 2009.

SUGITA, H., HIROSE, Y., MATSUO, N. & DEGUCHI, Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**, 1998; 165, 269–280.

TAKAHASHI, J.D.B. e URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2014; 86(3): ISSN 1678-2690.

TAKAHASHI, J.D.B. Imunoestimulante e imunidade de organismos aquáticos. In: **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. CAMPOS, C .M.; LIZAMA, M. L. A. P.; TAKEMOTO, R. M. Capítulo 13, 1ed. Maringá: Massoni, 2014. 342 p.: il.color.

TAVARES-DIAS, M. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - **Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal**, 2003.

TAVARES-DIAS, M., BOZZO, F. R., SANDRIN, E. F. S., CAMPOS-FILHO, E., MORAES, F. R. Células sangíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e espleno-somática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidade) na primeira maturação gonadal . **Acta Scientiarum**, Maringá. V.26. n .1, p. 73-80, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia – do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria, Jaboticabal**, v.14, p. 254-263, 1998.

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

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with Gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 28, p. 1-9, 2002.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em pisciculturas. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 35(2): 335 - 341, 2009.

TORROBA, M. & ZAPATA, A. G. Aging of the vertebrate immune system. **Microsc. Res. Technol.**, 2003, 62:477-481.

URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e biologia Aquática**. Editora Tecart, São Paulo, 2004; p. 171-193.

URIBE, C., FOLCH, H., ENRIQUEZ, R., MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, 2011, 56, (10): 486–503.

VALLEJO, A. N.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. **Annual Review of Fish Diseases**, **Oxford**, v. 2, p. 73- 89, 1992.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SOGRECOOS P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000.

YIRGA, H. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. **J. Prob. Health**, 2015; 3: 132. doi:10.4172/2329-8901.1000132.

YOSHINAGA T.; SEGAWA, I.; YAMANO, K.; IKEDA, H.; SORIMACHI, M. Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirane* in the Japanese flounder. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 31, n. 1, p. 19-23, 1996.

ZHAO, Y. *et al.* Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology** , 2012; (32) 750 e 755. doi:10.1016/j.fsi.2012.01.027.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

O artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista: ANAIS DA ACADÊMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.

Pseudoplatystoma reticulatum* em fase de treinamento alimentar suplementado com *Bacillus subtilis

Tatiane A. R. Rodrigues¹

¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Unidade de Aquidauana, Rodovia Aquidauana/UEMS km 12, Zona Rural Caixa Postal 2579200-000, Aquidauana – MS.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation with the probiotic *Bacillus subtilis* on performance, hematology and histology of juvenile *Pseudoplatystoma reticulatum* in feed training phase. The experimental design was completely randomized, with five treatments including control (probiotic-free) and four levels of inclusion of probiotic *B. subtilis* (10, 20, 30 e g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹) and four repetitions with 50 copies of juvenile cachara by repetition, with initial weight of 9,7± 1,07g , 30 days. Probiotic supplementation did not interfere in the weight gain, feed conversion, specific growth rate, survival and the haematological results. The group supplemented with diet containing 30 g x 10⁹ UFC/Kg⁻¹ de *B. subtilis* higher length of intestinal villi in relation to other treatments. The groups supplemented with probiotics showed a higher number of Goblet cells compared to the control group free of probiotic.

Key words: Fish, Hematology, Histology, Performance, Probiotic, *Pseudoplatystoma reticulatum*.

INTRODUÇÃO

A produção de pescado demonstra uma tendência de crescimento no cenário mundial (FAO 2015). O Brasil produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, destes 40% são provenientes de sistemas de criação intensiva e, cada região brasileira vem se especializando em determinados grupos de peixes. No Centro-Oeste o

destaque é a produção das seguintes espécies: tambaqui, pacu, os pintados e seus híbridos (MAPA, 2014).

Entre os grupos de peixes produzidos na região os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* apresentam características promissoras, pois possuem carne saborosa, macia, de coloração clara, onde não é encontrado espinho em forma de Y na musculatura; este grupo é apresentado no mercado pelas espécies *Pseudoplatystoma corruscan* (pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) e pelo cruzamento das duas espécies o híbrido *Pseudoplatystoma* spp. (CAMPOS, 2012, HONORATO, 2014; GONÇALVES, 2014).

Apesar do diagnóstico positivo para investimento no sistema de produção intensiva de peixes os surtos de doenças ocasionadas por parasitos e bactérias podem tornar esta prática onerosa e pouco lucrativa ao piscicultor, principalmente nas fases iniciais dos peixes.

Entre as principais bactérias patogênicas nas pisciculturas podemos ressaltar as *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae*, onde muitas vezes o controle destas tem sido realizado por antibióticos, porém a utilização indiscriminada de antibióticos possui um alto risco, devido ao grande impacto ambiental que essas drogas ocasionam, a seleção de bactérias resistente e os resíduos dessas substâncias que ficam presentes na carcaça dos peixes (FIGUEIREDO, 2008).

Uma das alternativas para substituição dos antibióticos no sistema produtivo é a utilização dos probióticos. Em outubro de 2001, a FAO/OMS (FAO/WHO, 2001), intitulou o termo probiótico como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro".

O modo de ação que as bactérias probióticas atuam no hospedeiro é melhorando a utilização dos alimentos, modulando a microbiota intestinal, estimulando a resposta imune e inibindo a colonização de patógenos no trato gastrointestinal melhorando o desempenho de peixes (FULLER, 1989; BOMBA et al., 2002).

O que torna estas bactérias benéficas desejáveis é o fato de serem habitantes normais do organismo, se reproduzem rapidamente, produzem substâncias antimicrobianas e resistem ao tempo entre a fabricação e comercialização podendo ser incluídas na ração antes ou depois da peletização e após a extrusão, possibilitando a recuperação das bactérias probióticas no intestino dos peixes (ANJO, 2004; NAKANDARE, 2013).

Foram relatados resultados positivos de desempenho zootécnico e sobrevivência de pós-larvas e juvenis de peixes suplementados com probiótico (EL- HAROUN 2006; FERREIRA, 2012). No trato gastrointestinal, o probiótico pode provocar alteração da microbiota intestinal, modulação da resposta imune e ajuda nas funções metabólicas, proporcionando um melhor crescimento, bom estado de saúde e resistência às doenças (KIRON, 2012).

Entre as espécies probióticas utilizadas na aquicultura o *Bacillus subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e demonstrou capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *Aeromonas hydrophila*, na alimentação da tilápia-do-Nilo foi eficaz como promotor de crescimento além de aumentar a imunidade (ALY et al., 2008). O *B. subtilis*, apresenta propriedades benéficas quando incorporado às dietas, incluindo imunoestimulação e resistência às doenças (CEREZUELA et al. 2012).

Este estudo avaliou os efeitos da inclusão do probiótico *B. subtilis* na dieta de juvenis de cachara durante a fase de condicionamento alimentar e as possíveis alterações que este probiótico pode proporcionar nas variáveis produtivas, hematológicas e histológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

LOCAL DO EXPERIMENTO E MANEJO

O experimento foi conduzido em Terenos (20°25'58.2"S 55°17'09.1"W) no Estado de Mato Grosso do Sul durante o período de 30 dias. Foram utilizados juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* na fase de treinamento alimentar. Os peixes foram distribuídos em 50 caixas de fibra de 500 L (n= 50), com aeração e fluxo de água contínuo.

Para realizar o manejo dos peixes era necessário submetê-los ao anestésico eugenol na concentração de 50 mg L⁻¹, até a perda do equilíbrio, evitando possíveis danos físicos. Os juvenis foram pesados e medidos, com o auxílio de balança eletrônica e ictiômetro, procedimento que foi realizado no início do experimento. Os juvenis iniciaram o experimento com o peso inicial de 9,7±1,07 g e comprimento de 11,9 ± 1,01 cm.

Os peixes passaram por aclimatação durante 7 dias. Receberam alimentação até a saciedade aparente, o alimento úmido experimental utilizada na piscicultura (ração

farelada + coração bovino moído). Simultaneamente, foram ajustados os horários da alimentação para o período noturno, nos horários de 18:00 h, 21:00 h, 00:00 h, 03:00 h.

Diariamente foi realizada a limpeza das unidades experimentais, as quais foram sifonadas para retirada de fezes e resto de ração. O monitoramento da qualidade da água foi realizado duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde) avaliando-se o pH (manhã $7,3 \pm 0,02$ e tarde $7,3 \pm 0,02$), oxigênio dissolvido (manhã $11,2 \pm 0,1$ e tarde $10,6 \pm 0,12$) e temperatura da água (manhã $21,4 \pm 1,27^{\circ}\text{C}$ e tarde $21,7 \pm 1,23^{\circ}\text{C}$) das unidades experimentais, com aparelho digital multiparâmetro YSI. Amônia (0 ppm) e nitrito (0 ppm) foram monitorados diariamente com kit comercial LabconTest.

PLANO NUTRICIONAL

A alimentação úmida utilizada para o experimento consistia de uma ração comercial farelada (contendo 42% de proteína bruta) misturada com coração bovino moído, oferecida 4 vezes durante o período noturno *ad libitum*, horário de maior atividade dos peixes. Essa dieta é utilizada convencionalmente na piscicultura.

Com o início do experimento a cada sete dias a porcentagem de ração farelada incorporada à alimentação dos peixes era aumentada, em contrapartida a porcentagem de coração moído incorporado à alimentação decrescia; seguindo o protocolo do treinamento alimentar:

- 1) Alimento úmido - composto de 70% de ração farelada e 30% de coração bovino moído (1ª semana);
- 2) Alimento úmido – composto de 80% de ração farelada e 20% de coração bovino moído (2ª semana);
- 3) Alimento úmido – composto de 90% de ração farelada e 10% de coração bovino moído (3ª semana);
- 4) Alimentação úmida (4ª semana) – composta somente de ração umedecida com água.

A análise bromatológica da ração comercial utilizada no experimento foi realizada no laboratório comercial Mercolab Laboratórios Ltda, em Chapecó - SC, e os níveis por quilo do produto da ração comercial podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1- Composição da ração comercial utilizada no experimento

ITEM	RAÇÃO
Proteína bruta (%)	41,47
Extrato etéreo (%)	8,35
Fibra detergente ácido (%)	3,86
Fibra detergente neutro (%)	17,41
Matéria seca (%)	90,38
Umidade (%)	9,62

Com o início do experimento foi incorporado a esta dieta o probiótico *B. subtilis* de acordo com os tratamentos nos níveis de 10, 20, 30 e 40 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias). As concentrações do probiótico nos tratamentos permaneceram as mesmas durante todo período experimental. O probiótico comercial Calsporin®10 contendo *Bacillus subtilis* na concentração de 10⁹ UFC⁻¹ foi adicionado na ração comercial farelada por meio de veículo oleoso (2% de óleo de soja) para a incorporação do probiótico.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os juvenis de *P. reticulatum* foram distribuídos em 20 caixas d'água (50 peixes em cada). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (incluindo o controle) e quatro repetições (unidades experimentais). Foram avaliados quatro níveis de inclusão do probiótico *B. subtilis* na concentração de 10⁹ UFC⁻¹ incorporados a dieta dos juvenis de *P. reticulatum* na fase de treinamento alimentar mais um grupo controle.

- 1) Tratamento 1 (controle): Alimento úmido isento do probiótico;
- 2) Tratamento 2 : Alimento úmido + *B. subtilis* 10 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹
- 3) Tratamento 3: Alimento úmido + *B. subtilis* 20 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹
- 4) Tratamento 4: Alimento úmido + *B. subtilis* 30 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹
- 5) Tratamento 5: Alimento úmido + *B. subtilis* 40 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Ao término do período experimental (30 dias), os animais foram submetidos a um jejum por 24 h 00 min. e em seguida anestesiados com eugenol a 50 mg. L⁻¹ para

realização da biometria, onde 20% dos animais foram contados e pesados para avaliação dos seguintes parâmetros:

- a) Ganho de peso (GP) = (peso final – peso inicial)
- b) Ganho em peso diário (GPD) = (ganho em peso/dias de experimento)
- c) Taxa de crescimento específico (TCE) = $(100 \times (\ln \text{ peso médio final} - \ln \text{ peso médio inicial}) / \text{dias de experimento})$
- d) Conversão alimentar (CA) = (alimento consumido/ganho em peso)
- e) Sobrevivência (S) = $(100 \times \text{número de animais final}) / \text{número de animais inicial}$.

HEMATOLOGIA

Foram colhidas amostras de sangue de 8 peixes por tratamento (2 peixes de cada repetição). Os juvenis foram anestesiados com eugenol a 50 mg L⁻¹ e retiradas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, utilizando seringas e agulhas descartáveis banhadas em EDTA.

Foi determinado o hematócrito (Ht) pelo método de microhematócrito de Goldenfarb et al. (1971). A dosagem de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método de cianometahemoglobina de Collier (1944) e a contagem do número de eritrócitos (Er) foi realizada em câmara de Neubauer utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato em microscópio óptico (400 X).

A partir dos dados de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) , hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de Wintrobe (1934).

As extensões sanguíneas foram confeccionadas em duplicata de cada animal, secas ao ar e coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa- Wright (Tavares-Dias , 2000) e realizada a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de trombócitos e leucócitos.

Para determinação de glicose foi utilizado o kit glicose PAP liquiform pelo método do ponto final. O sangue foi colhido em seringas banhadas em glistab (anticoagulante e antiglicolítico), transferido para um tubo falcon e centrifugado na velocidade 3000 g por 5 minutos. O plasma transferido para microtubo de 2,5 ml e mantido sob refrigeração (2 a 8°) até o momento da realização da análise.

No tubo falcon, foram adicionados 2 mL do reagente (Glicose PAP Liquiform) e 20 µL do plasma, depois colocado em banho-maria a 37°C por 15 minutos, a leitura das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 505 nm de absorbância. Em seguida determinado o fator de correção e o cálculo da glicose: Fator de Correção = 100/absorbância do padrão; e glicose (mg dL⁻¹) = absorbância da amostra X Fator de Correção.

MORFOMETRIA INTESTINAL

Os mesmos peixes utilizados para colheita sanguínea foram reaproveitados para coleta do intestino (2 peixes por repetição) para posterior análise histológica, foram submetidos à eutanásia por anestesia profunda com eugenol a 50 mg L⁻¹ e foi retirado um segmento de 3,0 cm, distante 3,0 cm do piloro, para retirada da porção anterior do intestino.

Os fragmentos do intestino foram colocados em solução de Bouin durante 4 horas. A conservação posterior foi feita em etanol 70 % até o momento do processamento histológico de rotina. Os intestinos foram cortados transversalmente e assim realizados a clivagem em seguida desidratados (álcool etílico), diafanizados (xilol) e embebidos em parafina a 60°C na estufa, e para finalmente serem emblocados na parafina. Os tecidos emblocados foram cortados em micrótomo em cortes com 5 µm de espessura, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina (HE) e periódico-Schiff (PAS).

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio óptico Nikon E-200 nas objetivas de 4x , 10 x e 40 x . A morfometria realizada com auxílio do “software” programa Motic Image Plus 2.0 ML.

Foram analisadas as seguintes medidas (Figura 2): altura do vilo (corresponderam à distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular) altura total das vilosidades (correspondem do ápice das vilosidades até o término da serosa), largura dos vilos, e espessura do epitélio, lâmina própria, camada da mucosa, camada da submucosa e camada muscular.

Foram selecionados oito vilos por corte transversal para leitura das variáveis morfométricas , totalizando 64 leituras de vilosidade por tratamento. As contagens de células calciformes foi realizado por área (mm ²) de acordo com Padra (2014).



Figura. 2. Parede intestinal de *Pseudoplatystoma reticulatum*: (A) altura das vilosidades; (B) altura total das vilosidades; (C) largura das vilosidades; (D) espessura do epitélio das vilosidades, (E) espessura da camada muscular e (F) células caliciformes.

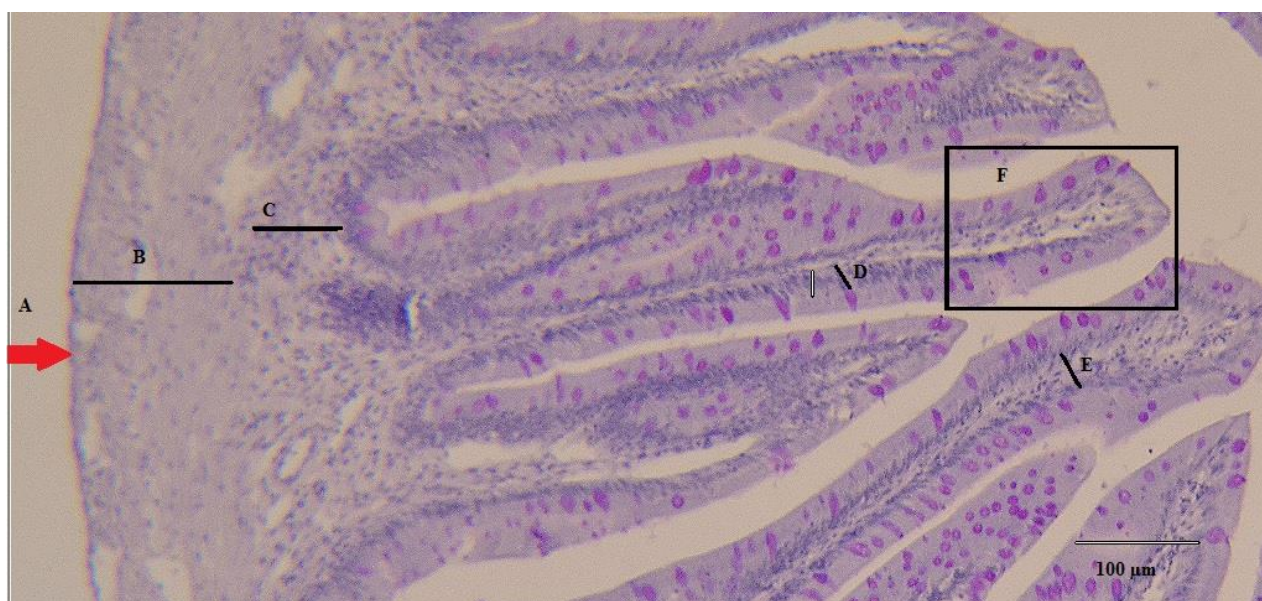


Figura 3. Parede intestinal de *P. reticulatum* : (A) serosa; (B) camada muscular; (C) submucosa; (D) mucosa, (E) lâmina própria e (F) área apical do vilo com células caliciformes.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros da qualidade da água, desempenho zootécnicos e histológicos, foram submetidos ao programa estatístico R versão 3.2.2 e realizada a análise de variância (ANOVA) com nível de significância a 5 %. Quando as médias apresentaram diferenças significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para os dados hematológicos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância para dados não-paramétricos.

RESULTADO

Os dados de desempenho zootécnico (Tabela 2) do presente estudo demonstraram que a suplementação com o probiótico não interferiu nos parâmetros de ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e a sobrevivência.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do peso inicial (PI), peso (PF), ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência (S) de juvenis *P. reticulatum* suplementados *B.subtilis*

TRAT	PI(g)	PF(g)	GP(g)	GPD(g.dia ⁻¹)	CA(g)	TCE(cm)	S (%)
Controle	10.3 ± 1.04	23.9 ± 1.7	13.6 ± 2.56	0.44 ± 0.09	2.9 ± 0.52	0.84 ± 0.15	86.5 ± 5.7
10g. Kg ⁻¹	9.6 ± 0.9	23.5 ± 1.1	13.9 ± 1.35	0.46 ± 0.04	2.8 ± 0.24	0.89 ± 0.10	89.5 ± 3.5
20g. Kg ⁻¹	9.8 ± 1	23.5 ± 2.6	13.67 ± 2.44	0.45 ± 0.08	3.04 ± 0.60	0.87 ± 0.15	91.5 ± 2.5
30g. Kg ⁻¹	10.05 ± 1.7	21.9 ± 1.7	12.5 ± 1.64	0.41 ± 0.05	3.2 ± 0.57	0.78 ± 0.07	89 ± 4.1
40g. Kg ⁻¹	9.1 ± 0.25	22.3 ± 2.3	13.15 ± 2.57	0.43 ± 0.08	3.05 ± 0.57	0.88 ± 0.12	91 ± 1.1

Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos para as variáveis apresentadas.

Desta forma a suplementação com o probiótico *B. subtilis* no presente trabalho não influenciou os parâmetros zootécnicos.

Foi demonstrado que a suplementação com o probiótico *B. subtilis* não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos para os resultados do eritrograma (Tabela 3). Nas extensões sanguíneas coradas foi possível a observação de

eritrócitos, trombócitos e seis variedades leucocitárias representadas pelos linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e célula granulocítica especial (CGE).

Os resultados dos valores relativos e absolutos expressos das contagens nas tabelas 4, 5 e 6, das contagens totais e diferenciais, revelaram que os leucócitos e neutrófilos foram as variedades celulares mais frequentes e abundantes em todos os tratamentos. Não houve diferença significativa para linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células granulocíticas especiais (CGE). Os valores absolutos das contagens totais de leucócitos (Tabela 5) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 3. Eritograma . Valores médios e desvio padrão para hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb), hemácias (RBC), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (VCM) e glicose (G) de juvenis de *P. reticulatum* suplementados com *B. subtilis*.

TRAT	Hct (%)	Hb (g dL ⁻¹)	RBC (10 ⁶ µL ⁻¹)	CHCM (g dL ⁻¹)	HCM (pg)	VCM (fL)	G (mg dL ⁻¹)
Controle	15.0 ± 3.87	3.10 ± 0.68	3.00 ± 0.79	22.34 ± 5.3	10.80 ± 3.04	51.50 ± 12.91	29.83 ± 6.48
10g. Kg ⁻¹	16.3 ± 8.02	5.18 ± 3.18	3.45 ± 0.30	29.99 ± 8.5	14.55 ± 7.90	46.19 ± 19.41	36.94 ± 8.03
20g. Kg ⁻¹	18.7 ± 3.30	4.52 ± 1.43	3.41 ± 0.90	24.37 ± 7.6	13.15 ± 1.53	57.31 ± 15.56	27.46 ± 8.50
30g. Kg ⁻¹	14.0 ± 2.54	3.17 ± 1.13	2.38 ± 0.60	26.00 ± 7.3	13.38 ± 5.89	54.61 ± 21.62	36.68 ± 5.33
40g. Kg ⁻¹	17.4 ± 4.66	4.14 ± 2.21	2.87 ± 1.28	26.54 ± 1.2	18.69 ± 9.05	81.12 ± 61.49	29.39 ± 6.01

Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos para qualquer das variáveis apresentadas.

Tabela 4. Valores relativos (%) das contagens diferenciais de leucócitos do sangue de juvenis de *P. reticulatum* alimentados com dietas suplementadas com *Bacillus subtilis* durante 30 dias.

TRAT	NEUT (%)	EOS (%)	BASÓ (%)	LINF (%)	MONÓ (%)	CGE (%)
Controle	12.1 ± 4.49 ^a	0,375 ± 0,75 ^a	0 ± 0 ^a	78,8 ± 8,93 ^a	0,5 ± 0,70 ^a	1.8 ± 1.03 ^a
10g. Kg ⁻¹	21.8 ± 18.7 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	63,8 ± 26,9 ^a	3,16 ± 1,5 ^b	3 ± 0.86 ^a
20g. Kg ⁻¹	9.5 ± 4.84 ^a	0 ± 0 ^a	0,25 ± 0,125 ^a	82,7 ± 9,94 ^a	0,12 ± 0,25 ^a	1.8 ± 1.43 ^a
30g. Kg ⁻¹	14.5 ± 5.94 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	79,8 ± 6,18 ^a	0,62 ± 0,94 ^a	1.5 ± 1 ^a
40g. Kg ⁻¹	7.5 ± 3.39 ^a	0,25 ± 0,125 ^a	0 ± 0 ^a	88,4 ± 4,76 ^a	0,12 ± 0,25 ^a	0.8 ± 0.44 ^a

NEUT = Neutrófilo; EOS = Eosinófilo; BASÓ = Basófilo; LINF= Linfócito; MONÓ = Monócito; CGE= Células granulocíticas especial. Os valores que apresentam letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão das contagens diferenciais de leucócitos do sangue de juvenis de *P. reticulatum* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis do probiótico *Bacillus subtilis* durante 30 dias.

TRAT	NEUT (x 10 ³ µL ⁻¹)	EOS (x 10 ³ µL ⁻¹)	BASÓ (x 10 ³ µL ⁻¹)	LINF (x 10 ³ µL ⁻¹)	MONÓ (x 10 ³ µL ⁻¹)	CGE (x 10 ³ µL ⁻¹)
Controle	3,5 ± 0,2	1,9 ± 3,8	0 ± 0	21,8 ± 1,7	0,7 ± 0,1	2,9 ± 4,9
10g. Kg ⁻¹	8,1 ± 0,7	0 ± 0	0 ± 0	6,5 ± 5,8	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,5
20g. Kg ⁻¹	3,3 ± 2,6	0 ± 0	0,2 ± 0,5	22,3 ± 2,0	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,3
30g. Kg ⁻¹	3,5 ± 1,6	0 ± 0	0 ± 0	9,3 ± 1,0	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0,2
40g. Kg ⁻¹	1,7 ± 1,0	0,3 ± 0,6	0 ± 0	10,0 ± 1,3	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1

NEUT = Neutrófilo; EOS = Eosinófilo; BASÓ = Basófilo; LINF= Linfócito; MONÓ = Monócito. Os valores que apresentam letras diferentes, diferem estatisticamente.

Tabela 6 Valores médios absolutos e desvio padrão da contagem total de leucócitos e trombócitos do sangue de juvenis de cachara alimentados com dietas contendo diferentes níveis do probiótico *Bacillus subtilis* durante 30 dias.

TRAT	LEUCÓCITOS (x 10 ³ µL ⁻¹)	TROMBÓCITOS (x 10 ³ µL ⁻¹)
Controle	24,7 ± 1,0	13,4 ± 5,4
10g. Kg ⁻¹	39,2 ± 0,4	19,7 ± 5,3
20g. Kg ⁻¹	33,0 ± 1,6	45,6 ± 5,2
30g. Kg ⁻¹	24,5 ± 0,6	8,8 ± 9,2
40g. Kg ⁻¹	23,3 ± 1,0	51,9 ± 24,9

Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos para as variáveis apresentadas.

As variáveis analisadas para histomorfometria intestinal descritos na tabela 7 demonstraram que apenas o tratamento 4 (30g Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹ de *B. subtilis*) diferiu dos outros tratamentos com maior altura de vilosidades e a espessura do epitélio deste tratamento foi maior que o do grupo controle. Os grupos tratados com probiótico apresentaram maior espessura da mucosa e submucosa, nos tratamentos incorporados com 10, 20 e 40 g Kg⁻¹ x 10⁹ UFC de *B. subtilis*, foi verificado maior espessura da camada muscular nos peixes que receberam 20, 30 e 40 g Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹ de probiótico *B. subtilis* foram obtidos a maior quantidade de células caliciformes.

Tabela 7. Variáveis morfométricas do intestino de juvenis de cachara alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão do probiótico *Bacillus subtilis* durante 30 dias.

Índices histomorfométricos	TRATAMENTOS				
	Controle	10 g. Kg ⁻¹ x 10 ⁹ UFC ⁻¹	20 g. Kg ⁻¹ x 10 ⁹ UFC ⁻¹	30 g. Kg ⁻¹ x 10 ⁹ UFC ⁻¹	40 g. Kg ⁻¹ x 10 ⁹ UFC ⁻¹
Comprimento total do vilo (µm)	245,7 ± 31,4 ^a	270,85 ± 48,4 ^a	276,1 ± 46,7 ^a	314,05 ± 46,5 ^b	253,5 ± 24,6 ^a
Comprimento do vilo (µm)	226,4 ± 31,6 ^a	246,7 ± 45,6 ^a	259,3 ± 48,6 ^a	294,9 ± 39,3 ^b	230,8 ± 26,5 ^a
Espessura do vilo (µm)	29,1 ± 5,1 ^a	31,7 ± 7,1 ^a	30 ± 4,3 ^a	33 ± 5,5 ^a	30,3 ± 5,5 ^a
Espessura do epitélio	8,2 ± 1,3 ^a	8,8 ± 1,3 ^{ab}	9,3 ± 1,6 ^{ab}	9,9 ± 2,3 ^b	9,2 ± 1,3 ^{ab}
Lâmina própria (µm)	8,36 ± 2,5 ^a	9,3 ± 3,2 ^a	9,38 ± 2,36 ^a	10,91 ± 3,18 ^a	10,03 ± 2,13 ^a
Camada da mucosa (µm)	4,9 ± 1,3 ^a	6,5 ± 1,3 ^b	7,3 ± 1,8 ^b	7,01 ± 1,3 ^b	6,7 ± 1,3 ^b
Camada da submucosa (µm)	12,8 ± 4,3 ^a	17,9 ± 4,4 ^b	18,9 ± 4,4 ^b	15,5 ± 4 ^b	21,8 ± 2,8 ^b
Camada muscular (µm)	20,5 ± 5,8 ^a	24,2 ± 6,6 ^b	26,3 ± 4,5 ^b	16,6 ± 4,1 ^a	25,7 ± 3,6 ^b
Número de células caliciformes (mm ²)	18,7 ± 7,1 ^a	23,7 ± 13,6 ^a	35,8 ± 9,1 ^b	38,9 ± 16,8 ^b	42,5 ± 13,1 ^b

Os valores que apresentam letras diferentes entre os tratamentos diferem estatisticamente entre si.

DISCUSSÃO

Resultados semelhantes ao nosso estudo foram relatados por Carvalho (2011) e Dias (2011) após a incorporação de *Bacillus subtilis* na dieta de alevinos de tilápia do Nilo e na larvicultura *Brycon amazonicus* nos períodos de setenta e noventa dias respectivamente, após a suplementação verificou que inclusão *B.subtilis* na dieta não favoreceu o desempenho zootécnico e a taxa de sobrevivência.

No entanto Azevedo (2016) observou resultados positivos para conversão alimentar aparente, ganho relativo de biomassa e biomassa final após suplementar por

cinquenta e seis dias juvenis de tambaqui com *B. subtilis* (2 g kg⁻¹) e grupo suplementado com probiótico *B. subtilis* + prebiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) obteve melhor resultado para crescimento total. Assim como Avella et al. (2010) utilizou uma combinação de espécies de bactérias do gênero *Bacillus* (*B. strains*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*) na larvicultura de *Sparus aurata* foi verificado os benefícios do probiótico em relação a resposta ao estresse e o crescimento das larvas.

Levamos em consideração que as enzimas digestivas mais importantes produzidas pelo *Bacillus subtilis* inclui como condição ótima para atuação uma temperatura de 37°C (IBRAHIM et al., 2012) e pH próximos 6,8 (VIDYALAKSHMI et al., 2009), a temperatura observado no nosso estudo durante o período experimental foi de 21,4± 1,27 °C e 21,7± 1,23 °C o que pode ter inibido sua ação eficiente e influenciar o desempenho produtivo.

Outro fator importante é que os juvenis de cacharas (*Pseudoplatystoma reticulatum*) estavam na fase de condicionamento alimentar durante o experimento o que pode ter influenciado a absorção de nutrientes. Barbosa (2011) comparou alevinos de pintado puros (*Pseudoplatystoma corruscans*) e híbridos durante a transição alimentar, e observou no seu estudo que em pintados atividade da amilase pode variar conforme a dieta, e proteínas bioativas e termoestáveis do plasma sanguíneo estimulam a ingestão de alimentos e conversão alimentar, a retenção do nitrogênio e o crescimento animal, mas inibem o catabolismo provocando atrofia intestinal e atrasam a renovação celular do epitélio do intestino (THOMPSON et al., 1989; JIANG et al., 2000; LUNDSTED et al. 2004). Foi relatado nesse estudo que os animais híbridos apresentaram maior velocidade de crescimento intestinal e plasticidade intestinal (tanto para crescimento quanto para redução) aumentando a área para absorção dos nutrientes o que lhes permitiu obter melhor desempenho no final do condicionamento alimentar (BARBOSA, 2011).

A observação de taxas de mortalidade em todos os grupos é devido à ocorrência do canibalismo nesta fase de treinamento alimentar, os *Pseudoplatystoma reticulatum* puros são mais agressivos, e geralmente o crescimento do lote não é uniforme (BARBOSA, 2011), fazendo com que os peixes maiores comam os menores, por isso é essencial a classificação periódica dos juvenis (INOUE, 2009).

A determinação da sobrevivência foi realizada pela contagem direta dos animais, os resultados observados para sobrevivência no nosso estudo são considerados satisfatórios, pois Machado et al. (1998) obteve uma taxa de sobrevivência de 78%,

após 84 dias de transição alimentar de alevinos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), para espécie *Cichla monoculus* (tucunaré) a sobrevivência foi de 75% durante o condicionamento alimentar realizado por Soares et al. (2007) durante 30 dias.

Nessa fase de treinamento alimentar as mudanças nos resultados das contagens de glóbulos vermelhos, hematócrito, hemoglobina e outras variáveis hematológicas são indicadores importantes sobre o estado de saúde do peixe e suas relação com fatores ambientais, de estresse e doenças, que podem ocasionar um desequilíbrio na homeostase dos peixes (BASUSTA, 2005) . Entretanto foram observados valores abaixo do referencial para os parâmetros de hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) para todos os grupos durante o período experimental. As hemácias (RBC), hemoglobina (Hb), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), permaneceram dentro da faixa de referência para os peixes do gênero *Pseudoplatystoma*, da mesma forma que os resultados obtidos para glicose (G) não diferindo estatisticamente entre os tratamentos.

Semelhante ao nosso estudo Telli (2014) observou que administração de *B. subtilis* na dieta de tilápia do Nilo durante 84 dias em diferentes densidades estocagem resultou no decréscimo no número de hemácias e hematócrito nos peixes criados em alta densidade de estocagem.. Outro resultado interessante foi observado após a inclusão de *B. subtilis* durante o período de sessenta dias na dieta *Catla catla* (Hamilton) pois a taxa de hemoglobina não diferiu entre os grupos tratados e o controle, somente após desafiados o nível de hemoglobina diminuiu em todos os tratamentos (KUMAR, 2015).

Tavares-Dias (2009) descreveu os valores de referências para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *P. corruscans*) para hemoglobina devem oscilar entre 4,2 – 7,1 g.dL⁻¹; hematócrito 25,0 – 41,0 (%); VCM 145,0 - 236,8 fL; CHMC 12,5 - 21,3 g.dL⁻¹; RBC 1,350 - 2,820 10⁶μL⁻¹. Ranzai-Paiva (2005) fez uma comparação sanguínea para cachara de acordo com as várias classes de comprimento, e na classe de peixes do tamanho de 20 a 29,9 cm os valores de hemoglobina registrado foram de 5.4 g.dL⁻¹ , RBC 2,06 10⁶μL⁻¹, hematócrito 24.3 % , VCM 117.7 fL , HCM 26.0 (pg) e CHCM 22.0 g.dL⁻¹. No presente estudo os resultados do eritograma foram muito próximos dos descritos por Ranzani-Paiva (2005) e Tavares-Dias (2009), apenas os valores de volume corpuscular média, hemoglobina corpuscular média e hematócrito foram um pouco abaixo dos descritos pelos autores.

Vários fatores podem influenciar os índices hematimétricos principalmente fatores estressantes, nutricionais e do ambiente e interferir na eritropoiese (LABARRERE, 2012). Pickering (1981) classificou os principais agentes estressores em um sistema de produção de peixes como sendo: químicos (qualidade da água, poluição, composição da dieta e resíduos metabólicos), biológicos (densidade populacional, presença de outras espécies de peixes e de microrganismos), físicos (temperatura, luz, sons e gases dissolvidos) e de manejo (manuseio, transporte e tratamento de doenças).

Os baixos valores de Hct encontrados nos *P. reticulatum* na fase de treinamento alimentar, podem ter sido afetados pela baixa temperatura da água (YAZICI, 2015). O nosso estudo foi realizado em uma piscicultura comercial que não possuía sistema de aquecimento da água nas unidades experimentais no período de julho (no inverno), no qual a temperatura média da água durante os trinta dias foi de 21°C. Segundo Rebouças (2014) a faixa ótima para peixes neotropicais é de 25 °C a 32 °C. Desta forma o valor anormal para alguns parâmetros hematológicos pode estar relacionado com a temperatura da água no período experimental.

As mudanças fisiológicas nos peixes em resposta às baixas temperaturas foram classicamente separadas em três fases e a segunda fase envolve mudanças hematológicas, osmorregulatórias, enzimáticas do sangue (MEZAUD et al., 1977). Peixes expostos à baixa temperatura apresentam redução do metabolismo, o que pode afetar a condição fisiológica e determinar a redução do perfil hematológico.

Segundo Yazici (2015) *Oncorhynchus mykiss* suplementadas durante 60 dias com os probióticos *Lactobacillus plantarum* e *B. subtilis*, e condicionadas a temperatura da água mais baixa (17 °C) apresentaram resultados com valores baixos para a contagem dos glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina. O estudo realizado por Jerônimo (2015) mostrou valores de hematócrito e contagem de células brancas do sangue (RBC) superior na estação quente do que na estação fria.

A hemoglobina e hematócrito têm seu quantitativo alterado pela eficiência de transporte de oxigênio, possuindo variação de acordo com a temperatura de criação (SANTOS et al., 2004). Estas variáveis podem ser influenciadas, além da temperatura da água por níveis de oxigênio dissolvido e estado nutricional do animal que está diretamente relacionado a alimentação (RANZANI-PAIVA et al., 2000; CHAGAS e VAL, 2003; CARVALHO et al., 2009). O aumento dos níveis de hemoglobina e hematócrito são indícios da baixa eficiência no transporte de oxigênio sanguíneo,

mostrando-se então, aumentados para compensar essa deficiência (SANTOS et al., 2004).

Apesar dos níveis de oxigênio dissolvido no presente estudo estarem dentro da faixa ideal para a criação de peixes, em temperaturas mais elevadas há menores concentrações de oxigênio o que ocasiona aumento nos níveis de hematócrito e hemoglobina, diferentemente no inverno onde há maior disponibilidade de oxigênio (COSTA, 2012). Além do que o estresse térmico assim como outros fatores estressantes pode ocasionar hemodiluição, e valores muito baixos de hematócrito tem sido observada em várias espécies submetidas a estímulos estressantes agudos (McDONALD & MILLIGAN, 1997; CHEN et al., 1995).

Como visto nos resultados acima as variáveis do eritrograma ajudam a identificar processos de anemias, estresse e fatores ambientais, enquanto os resultados do leucograma auxiliam o diagnóstico de infecções ou qualquer outro fator que influencie a homeostase dos peixes; os parâmetros de sangue são ferramentas biológicas essenciais para monitorar a saúde dos organismos e do seu ambiente (TAVARES-DIAS, 2009).

Foi demonstrado por Jerônimo (2015) o perfil hematológico do híbrido do *Pseudoplatystoma* sp. em sistema semi-intensivo e intensivo, em duas estações, inverno e verão, e os resultados foram semelhantes as contagens diferenciais e totais no mesmo período que foi realizado o presente estudo (inverno). O perfil hematológico do *Pseudoplatystoma reticulatum*. o grupo celular mais representativo foi o grupo dos linfócitos seguidos dos neutrófilos, corroborando também com o estudo realizado por Mouriño (2012) com o híbrido *Pseudoplatystoma* sp. .

Juvenis de talápia (*Oreochromis niloticus*) alimentados com uma mistura probiótica de 10 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹ de *B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*, demonstraram um aumento da concentração de células de defesas a partir da quarta semana, onde a contagem de linfócitos aumentou e estagnou seu aumento na semana cinco e seis, onde aumentaram o número de monócitos e trombócitos, ao mesmo tempo os peixes alimentados com a dieta controle apresentaram elevada proporção de trombócitos na quarta semana em relação aos demais grupos tratados de acordo com Iwashita (2015). Diferente dos resultados do nosso estudo onde foi realizado a suplementação com *B. subtilis* até a 4 semana.

Em contrapartida os resultados presentes neste estudo e na literatura sobre as respostas destes parâmetros, podem revelar diferenças atribuídas a diferença nas

espécies de peixes utilizadas nos ensaios, estágio de desenvolvimento, estirpe do probiótico, duração da alimentação, modo de suplementação ou condições ambientais (IWASHITA, 2015).

Analisando a porção anterior do intestino dos juvenis de cachara não foram observadas lesões e diferenças na largura das vilosidades, semelhante ao resultado de Silva (2015) no qual *Oreochromis niloticus* L. suplementada durante 90 dias com *B. subtilis*, mostrou diferenças significativas para altura das vilosidades nos grupos 5×10^6 UFC g⁻¹ e 1×10^7 UFC g⁻¹ de probiótico na dieta em relação ao controle.

Reda & Seli (2015) verificaram no seu estudo utilizando os probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* na dieta de *Oreochromis niloticus* L. durante 60 dias, que o aumento das vilosidades do intestino foi proporcional a maior taxa de inclusão na dieta dos grupos suplementados e os peixes alimentados com probiótico teve maior número de células caliciformes em todas as partes do intestino do que o grupo isento de probiótico na alimentação.

Outro estudo também realizado com a espécie tilápia do Nilo, relatou que os grupos tratados com os aditivos *Bacillus cereus* $4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹ e *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹, apresentaram vilosidades maiores em comprimento, mais espessas e maior número de células caliciformes presentes no intestino em relação ao grupo controle (HURZANA MELLO, 2013).

Resultados diferentes foram encontrados por Cerezuela (2013); não foi observada diferença significativa para as variáveis morfométricas do intestino, assim como os peixes alimentados com *B. subtilis* apresentaram números reduzidos de células caliciformes, juntamente com os animais alimentados com inulina e *B. subtilis*+inulina durante quatro semanas. Nunes (2013) após a caracterização morfométrica de intestino de surubins (*Pseudoplatystoma* sp.) alimentados por 20 dias com dieta suplementada com probiótico (*B. subtilis*) nas doses de 10, 20, 30 e 40 g. Kg⁻¹ x 10^9 UFC⁻¹ de ração, demonstrou através da análise de regressão efeito linear negativo dos níveis de probiótico sobre a altura dos vilos intestinais, sugerindo que não houve benefício do aditivo na morfometria intestinal.

. Os nossos resultados demonstraram que apenas grupo tratado com 30 g. Kg⁻¹ x 10^9 UFC⁻¹ de probiótico apresentou maior comprimento das vilosidades em relação aos demais tratamentos. Em relação ao número de células caliciformes no intestino neste estudo os maiores valores foram observados nos grupos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* em relação ao tratamento isento de probiótico.

Ressaltando que na fase treinamento alimentar comprimento do coeficiente do intestino podem tanto aumentar como diminuir ao longo do condicionamento e sua plasticidade morfológica é maior em juvenis híbridos do que espécies nativas puras, o que pode explicar que apenas em um dos grupos tratado com *B. subtilis* obteve maior comprimento total de vilosidades (BARBOSA, 2011).

Outro fator a ser considerado é que em alguns órgãos dos peixes ocorre hipertrofia para compensar os efeitos da diminuição da temperatura. Assim a hipertrofia de órgãos como fígado, coração e mucosa do intestino aumenta o metabolismo, a quantidade de enzimas e a área de absorção para aumentar seu desempenho ou o mantém (BALDISSEROTTO, 2009).

Os mecanismos de desenvolvimento muscular chamados de hiperplasia, recrutamento de fibras musculares, e hipertrofia, aumento do seu diâmetro, bem como sua interação também são diretamente afetados pela temperatura d ambiente em que o peixe se encontra (COSTA, 2012). Portanto, quando a temperatura está dentro da faixa ideal há o crescimento ideal.

O probiótico também estimula o desenvolvimento de células caliciformes no intestino (NAYAK, 2010). Sabe-se que a produção de muco pelas células caliciformes é mecanismo de defesa essencial, pois combate de forma eficaz a entrada de patógenos através desta barreira no trato intestinal, sendo que, o muco tem efeito bactericida e protege contra substâncias tóxicas e auxilia no transporte entre o conteúdo luminal e células epiteliais (ELIS, 2001; SMIRNOV *et al.*, 2005).

Algumas hipóteses são formuladas para explicar possíveis mecanismos pelos quais as bactérias probióticas podem interferir na barreira intestinal. Uma delas está relacionada às camadas de muco. Ao longo de todo o epitélio intestinal existem inúmeras células de Goblet (células caliciformes), essas células são glandulares polarizadas do tipo mucoso, pois secretam mucina, que se dissolve na água formando muco. Essa camada de muco fornece proteção contra antígenos e moléculas estranhas, ao mesmo tempo em que atua como lubrificante para a motilidade intestinal (OLA, 2006).

O muco é a primeira barreira que as bactérias intestinais encontram, e os patógenos precisam penetrá-la durante uma infecção para atingir as células epiteliais (PHILLIPSON *et al.*, 2008). Os probióticos podem promover secreção de muco como um dos mecanismos de melhorar a função de barreira e eliminação de patógenos.

Mack e colaboradores (1999) demonstraram que os *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* GG estimularam o aumento da regulação de genes em células caliciformes da mucosa intestinal. Além disso, o efeito desses probióticos na ativação e secreção de muco no intestino foi diretamente relacionado com a inibição e aderência da *Escherichia coli* patogênica, assim como dos danos no trato intestinal in vitro (WALKER, 2008).

Desta forma a suplementação com *B. subtilis* pode ter interferido na quantidade de células caliciformes, diferenças de espessura da mucosa e submucosa para os tratamentos suplementados com probiótico em relação ao controle.

CONCLUSÃO

A suplementação com o probiótico *B. subtilis* na dieta de juvenis de *P. reticulatum* não afetou o desempenho produtivo e a resposta hematológica dos peixes.. Os peixes alimentados com probiótico apresentaram melhores resultados para número de células caliciformes, espessura da mucosa e submucosa em relação ao grupo controle, o tratamento 30 g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹ *B. subtilis* obteve o melhor resultado para altura das vilosidades.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com o probiótico *Bacillus subtilis* no desempenho zootécnico, hematologia e histologia, em juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* em fase de treinamento alimentar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, incluindo o controle (isento de probiótico) e mais quatro níveis de inclusão do probiótico *B. subtilis* (10, 20, 30 e g. Kg⁻¹ x 10⁹ UFC⁻¹) e quatro repetições com cinquenta exemplares de juvenis de cachara por repetição, com peso inicial de 9,7± 1,07g, 30 dias. A suplementação probiótica não interferiu no ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, sobrevivência e nos resultados hematológicos. O grupo suplementado com a dieta contendo 30 g x 10⁹ UFC/Kg⁻¹ de *B. subtilis* apresentou maior comprimento de vilosidades do intestino em relação aos outros tratamentos. Os grupos suplementados com o probiótico apresentaram um número superior de células caliciformes em relação ao grupo controle isento de probiótico.

Palavras-chave: Peixe, Hematologia, Histologia, Desempenho, Probiótico, *Pseudoplatystoma reticulatum*.

REFERÊNCIAS

ALY, S.M., MOHAMED, M. F., JOHN G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Aquac. Res.** 2008 ;39:647 e 56.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular**; J. Vasc. Br. Vol.3, n.32, 2004.

AVELLA, M. A., GIOACCHINI, G., DECAMP, O., MAKRIDIS, P., BRACCIATELLI, C., CARNEVALI, O. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. **Aquaculture**, 2010; 30512–19. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.03.029.

AZEVEDO, R. V., FILHO, J. C. F., PEREIRA, S. L., CARDOSO, L. D., JÚNIOR, M. V. V., ANDRADE, D. R. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem . **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.51, n.1, p.9-16, jan. 2016 .DOI: 10.1590/S0100-204X2016000100002.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009. Ed. 2. 350p.

OLA, B. R.; OYSTEIN, E. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. 20 (2), 192 - 208 CrossRef. , Fish & Shellfish Immunology, 2006.

BARBOSA, O.N.; RAIZER, J.; GONDA, M.F.; SILVA, J.M. Desempenho e coeficiente intestinal de alevinos puros e híbridos de pintados em condicionamento alimentar. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.12, p.2621-2627, 2011.

BASUSTA, G.A.. Fish hematology and hematological techniques. In: Karatas M (ed) Research techniques in fish biology (in Turkish), 1st edn. Nobel Publications, Ankara, 2005, pp 275-300.

BOMBA, A., NEMCOVA, R., MUDROŇA, D., GUBA, P. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v.13, p.121-126. 2002.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, 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 UFMS, 2012; 335-361.

CARVALHO, J. V. de; LIRA, A. D. et al. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do –Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananligossacarídeo . **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.12, n.1, p.176-187 jan/mar, 2011 <http://www.rbspa.ufba.br> ISSN 1519 9940.

CEREZUELA, R., FUMANAL, M., TAPIA-PANIAGUA, S. T., MESEGUER, J., MORIÑO, M. A., ESTEBAN, M. A. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens / **Fish & Shellfish Immunology** 34 (2013) 1063e1070. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>.

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

CHAGAS, E.C., LOURENÇO J.N.P., GOMES L.C. & Val A.L. Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. Anais 12º Simpósio Brasileiro de Aquicultura, Goiânia, GO, p.83-93, ano de 2003.

CHEN, R.G., SUN, L.T.; LEE. Y.H., et al. Characteristic of blood in Common Carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. **J. Appl. Aquac.**, V.5, p. 21-31, 1995.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. Canadian Medical Association Journal, Vancouver, v.50, p.550-552, 1944.

EL-HAROON, E.R.; GODA, A.M.A-S. & CHOWDHURY, A.KEffect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feec utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture Research, .2006; 37(14):1473-80.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol.** 2001., 25: 827-839.

FERREIRA, A.H.C.; ARARIPE M. N.B.A.; MONTEIRO, C.A.B.; LOPES, J.B.; ARARIPE, H.G.A. Uso de probióticos na aquicultura – Revisão Artigo 176 - **REVISTA ELETRÔNICA NUTRITIME** Volume 9 - Número 05 – p. 1965 – 1980 - Setembro/ Outubro 2012 – ISSN 1983-9006.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL,C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes . **R. Bras. Zootec.** vol.37 Viçosa, July ,2008 .Online version ISSN 1806-9290.

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: <ftp://ftp.fao.org/esn/food/probioreport_en.pdf>.

FULLER, R. A review: probiotic in man and animals. **Journal Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.1034-1039. 1989.

GONÇALVES, A. F. N. Desempenho produtivo e resposta fisiológica de juvenis de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) alimentados com diferentes níveis de proteína e carboidrato. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal)- Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Dracena/ Campus de Ilha Solteira, SP, 2014.

GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, New York, v.56, p.35-39, 1971.

HONORATO, C. A.; CANEPPELE, A.; MATOSO, J. C.; PRADO, M. R.; SIQUEIRA, M. S.; SOUZA, L. R. O. Caracterização física de filés de Surubim

(*Pseudoplatystoma* sp.), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Pirarucu (*Arapaimas gigas*). **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 4, p. 237-242, out./dez. 2014.

HURZANA - MELLO, MORAES, J. R. R., NIZA, I. G., MORAES, R., OZÓRIO, R. O. A., SHIMADA, M. T., FILHO, J. R. E., CLAUDINO, G. S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 6, p. 724-730, June 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X20130006000006&lng=en&nrm=iso>. access on 03 May 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X20130006000006>.

IBRAHIM, S. E., AMIN, H.B.E., HASSAN, E.N., SULIEMAN, A.M.E. Amylase Production on solid State Fermentation by *Bacillus* Spp. **Food and Public Health**, v.2, n.1,30-35. Doi:10.5923/j.fph.20120201.06, 2012.

INOUE, L. A. K. A., HISANO, H., ISHIKAWA, M. M., ROTTA, M. A., SENHORINI, J. A. Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (pintado e cachara). Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. ISSN 1517-1973 100.

IWASHITA, M.K.P., NAKANDAKARE, I. B., TERHUNE, J. S., WOOD, T., RANZANI-PAIVA, M. J. T. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology** (2015) 1 e 7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.008> 1050-4648/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

JERÔNIMO, G.T., BRUM, A., PÁDUA, S.B., GONÇALVES, E. L. T., CAPECCI, R. S., ISHIKAWA, M. M., MARTINS, M. L. Haematological Parameters of the Hybrid Surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) farmed in Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.58 n.2: pp. 254-261, Mar/Apr 2015. Vol.58, n.2: pp. 254-261, March-April 2015 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400180> ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.

JIANG, R.; CHAN, G.X.; STOLL, B. et al. Biochemical and molecular action of nutrients. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v.130, p.21-26, 2000.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Anim. Feed Sci. Technol.**, 2012; 173:111-133.

KUMAR, R., MUKHERJEE, U. C., RANJAM, R., VANI, T., BRAHMACHARI, R. K. NAYAK, S. K. et al., Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on haematological and immunological parameters of *Catla catla* (Hamilton). **Aquacult Int.** 2015. Springer International Publishing Switzerland .DOI 10.1007/s10499-015-9883-x.

LABARRERE, C.R.; FARIA P.M.P.; TEIXEIRA, E.A.; MELO, M.M. .Eritrograma de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. coruscans*) mantidos em diferentes densidades de estocagem. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.2, p.510-514, 2012

LUNDSTEDT, L.M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology** - Part B, v.137, p.331-339, 2004.

MACHADO, J.H. Treinamento alimentar para aceitação de rações artificiais por alevinos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **In. Aquicultura Brasil** ‘, 1998. 98 (pp.52-53). Recife. Anais da ABRAq.

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

MAZEAUD, M.M., Mazeaud F. & DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *T. Am. Fish. Soc.* 106:201-212, ano de 1977.

McDONALD,G.; MILLIGAN,L. Ionic, osmotic and acid-baase regulation in stress. In: IWAMA, G.W.; et al., (Eds): *Fish stress and health in aquaculture*. **Cambridge: University Press**. 1997, p. 119-144.

Ministério da Pesca e Aquicultura. Produção.
<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>. Julho de 2014.

MOURIÑO, J.L.P., VIEIRA, F.N., JATOBÁ, A., SILVA, B.C., JESUS, G.F.A., SEIFFERT, W.Q., MARTINS, M.L. Effect of dietary supplementation of inulin and W. cibaria on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). **Aquac Nutr.** 2012; 18:73-80.

NAKANDAKAREL, I. B.; IWASHITAL, M. K. P.; DIASLL, D. C.; TACHIBANAL, L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSAL, E. Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.35 , n.4, p. 365-370, 2013

NAYAK,S.K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology** , 2010; (29)2e14. doi:10.1016/j.fsi.2010.02.017.

NUNES, A.L. Probiótico na dieta de surubins *Pseudoplatystoma* spp. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS. 2013.99p.

COSTA, D. P. Efeito da temperatura da água no desempenho e variáveis hematológicas e bioquímicas de juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri*. Dissertação de Mestrados em Zootecnia Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Ano de 2012. 54p.

PADRA, J. T.; SUNDH, H.; JIN, C.; KARLSSON, N. G. SUNDELL, K. *Aeromonas salmonicida* binds differentially to mucins isolated from skin and intestinal regions of Atlantic salmon in an N-acetylneuraminic acid dependent manner. **Infect. Immun**, 2014 . doi:10.1128/IAI.01931-14

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M.E.V.; HENRIKSNAS, J. et al. The gas tric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2008; 295: G806–G812.

PICKERING, A.D. Introduction: the concept of biological stress. In: PICKERING, A.D. (Ed.) *Stress and fish*. **London: Academic Press**, 1981. p.1-9.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA E.; ISHIKAWA C. M. Hematological parameters of "cachara", *Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766 (Osteichthyes, Pimelodidae), reared in captivity. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 31, n.1, p. 47 - 53, 2005.

REDA ,R. M. & SELIM, K. M. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* . **Aquacult Int** (2015) 23:203–217. DOI 10.1007/s10499-014-9809-z.

RIBEIRO, P.A.P.; COSTA, L.S.; LOGATO, P.V.R. Probióticos na aquicultura. **Revista eletrônica Nutritime**, v.6, nº1, p.837-846 Janeiro/Fevereiro, 2008.

SANTOS, G.M.; MÉRONA, B.; JURAS, A.A.; JÉGU, M. Peixes do baixo Tocantins: 20 anos depois da usina hidroelétrica de Tucuruí. Brasília: Eletronorte, 2004

SILVA, R.D., ROCHA, L. O., FORTES, B. D. A., VIEIRA, D., FIORAVANTI, M. C. S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pes.Vet.Bras.** Vol.32. Supl.1 Rio de Janeiro Dec. 2012. ISSN 0100-736 X.

SILVA, T. F. A., PETRILLO, T. R., YUNIS-AGUINAGA, J., MARCUSSO, P. F., CLAUDIANO, G. S., MORAES, F. R., MORAES, J. R. E. Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia . **Lat. Am. J. Aquat. Res.**, 43(5): 963-971, 2015 . DOI: 10.3856/vol43-issue5-fulltext-16.

SMIRNOV, A., PEREZ, R ., AMIT-ROMACH, E., SKLAN, D., & UNI, Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. **J. Nutr.** 2005., 135: 187-192.

SOARES, E. M., PEREIRA-FILHO, M., ROUBACH, R. & SILVA, R.C. Condicionamento alimentar no desempenho zootécnico do tucunaré. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca** 2 (Esp.), set. 2007.

TAVARES-DIAS, M. ISHIKAWA, M.M., MARTINS, M.L., SATAKE, F., HISANO, H., PÁDUA, S.B., JERÔNIMO, G.T., SANT'ANA, A.R. Hematologia:

Ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran Neto A, Mariano WS, Sória SFP (eds) Tópicos Especiais em Saúde e Produção Animal. São Carlos, 2009; p. 43-80.

TAVARES-DIAS, M., SCHALCH, S.H.C., MARTINS, M.L., et al. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) (Osteichthyes: Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.17, n.4, p.899-926, 2000a.

TELLI, G.S., RANZANI-PAIVA, M. J. T., DIAS, D. C., SUSSEL, F. R., ISHIKAWA, C. M., TACHIBANA, L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities . **Fish & Shellfish Immunology** 39 (2014) 305 e 311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.025>.

THOMPSON, J.S; SAXENA, S.K.; SHARP, J.G. Effect of eflorithine on intestinal regeneration. **Archives of Surgery**, v.124, n.4, p.454-457, 1989.

VIDYALAKSHMI, R., PARANTHAMAN, R., INDHUMATHI, J. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. **World Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.89-91, 2009.

YAZICI, et al. Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sublethal water temperature . **Marine Science and Technology Bulletin** (2015) 4 (2) :21-28.

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

CAPÍTULO 3 – ARTIGO

A comunicação científica foi elaborada de acordo com as normas da revista:
PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA (PAB).

Sobrevivência de juvenis *Pseudoplatystoma reticulatum* suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* desafiados com *Aeromonas hydrophila*

Tatiane A. R. Rodrigues ⁽¹⁾, Cristiane Meldau F. A. ⁽¹⁾ e Pamela T. N. Veiga⁽¹⁾

(1) Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade de Aquidauana, Rodovia Aquidauana UEMS km 12, Zona Rural , caixa postal 2579200-000, Aquidauana – MS. E-mail: taty_rodrigues12@hotmail.com, crismeldau@yahoo.com.br, pamela.thaynara@hotmail.com

Resumo - Este trabalho avaliou a sobrevivência de juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* em fase de treinamento alimentar ao desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*, após a suplementação com o probiótico *Bacillus subtilis*. Foram testados dois grupos experimentais desafiados com as concentrações $0,6 \times 10^6$ e $0,9 \times 10^6$ UFC (Unidade formadora de Colônia) *A. hydrophila* cada grupo dividido em cinco tratamentos níveis de inclusão do probiótico na alimentação : controle (n = 20), 10 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20), 20 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n= 20), 30 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20); 40 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20). A taxa de sobrevivência foi monitorada durante 15 dias. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa de sobrevivência entre os grupos suplementados com *Bacillus subtilis* e o grupo controle, a inclusão do probiótico não teve efeito benéfico aos juvenis *P. reticulatum* na fase de treinamento alimentar.

Termos para indexação: treinamento alimentar, cachara, sobrevivência, probiótico.

Survival of juvenile *Pseudoplatystoma reticulatum* supplemented with probiotic *Bacillus subtilis* challenged with *Aeromonas hydrophila*

Abstract : This work evaluated the survival of juvenile *Pseudoplatystoma reticulatum* in feed training phase to the bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*, after supplementation with the probiotic *Bacillus subtilis*. Two experimental groups were tested challenged with concentrations $0,6 \times 10^6$ e $0,9 \times 10^6$ UFC (Colony-forming Unit) *A. hydrophila* each group divided into five treatment levels of inclusion of probiotic in food : control (n = 20), 10 g. Kg^{-1} *B. subtilis* (n=20), 20 g. Kg^{-1} *B. subtilis* (n= 20), 30 g. Kg^{-1} *B. subtilis* (n=20); 40 g. Kg^{-1} *B. subtilis* (n=20). The survival rate was monitored during 15 days. The results showed that there was no significant difference in survival between groups supplemented with *Bacillus subtilis* and the control group, the inclusion of the probiotic did not have beneficial effect to juveniles *P. reticulatum* in food training phase.

Indexing term: feed training phase, cachara, survival, probiotic.

Introdução

O desenvolvimento de pacotes tecnológicos para espécies nativas de peixes é essencial para impulsionar o crescimento da produção de pescado no setor produtivo. Informações a respeito dos bagres carnívoros e sobre sua biologia e patologia nas fases iniciais das espécies puras e seus híbridos são escassas, assim como , as doenças que acometem esses peixes durante o processo produtivo e as estratégias para controle e erradicação das mesmas não são totalmente conhecidos (Ishikawa et al., 2012).

Uma das medidas profiláticas presente nas pisciculturas para inibir o avanço de doenças infecciosas nos peixes é a administração de antibióticos. Entretanto o uso abusivo e indiscriminado de antibióticos de acordo com Gastalho (2014) e Santos & Ramos (2016) pode resultar no desenvolvimento de bactérias resistentes capazes de transferir rapidamente para outras bactérias essas características, tanto por alterações no genoma existente quanto por transferência de material genético entre células, somado a presença de resíduos antimicrobianos em tecidos dos animais tratados, tornando-se parte da dieta dos consumidores.

A utilização de bactérias benéficas denominadas probióticos na produção intensiva de peixes é uma alternativa utilizada como medida mitigatória ao uso de antibióticos (Gatesoupe, 1999; Ravi et al., 2007), estas bactérias grans – positivas

inofensivas auxiliam no bem – estar do hospedeiro e visa contribuir direto ou indiretamente para a defesa desses animais contra agentes patogênicos bacterianos (Pandiyan et al., 2013).

Um dos probióticos amplamente utilizado na aquicultura é o do gênero *Bacillus* (Cutting, 2011; Ferreira et al., 2012), foram observados efeitos benéficos em relação a utilização este gênero, como melhora da microbiota intestinal do hospedeiro, aumento da resposta imune dos animais, maior sobrevivência frente alguns patógenos, produção de substâncias antimicrobianas, após a utilização desta bactéria benéfica (Raida et al., 2003; Pérez-Sánchez et al., 2013; Kumar et al., 2015).

Pouco se sabe sobre o uso de bactérias do gênero *Bacillus* como probiótico na dieta de bagres do gênero *Pseudoplatystoma* em pisciculturas. A fase inicial das espécies deste gênero é considerado uma etapa crítica para produção, devido a alta taxa de mortalidade dos peixes decorrente de doenças causadas por bacterioses e parasitoses, além do seu hábito carnívoro exigir treinamento alimentar (Ishikawa et al., 2012). Diante desta realidade há um crescimento na produção de peixes nativos em alguns países da América do sul, dentre estas espécies os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* são muito apreciados por causa da ausência de espinhos no filé e a carne de excelente qualidade de textura firme e coloração clara (Valladão et al., 2016)

Este estudo avaliou a sobrevivência dos juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* na fase de treinamento alimentar suplementados com o probiótico *Bacillus subtilis* durante trinta dias após o desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*.

Materiais e Métodos

O desafio experimental foi conduzido no Laboratório de Sanidade de Peixes , da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), unidade universitária de Aquidauana, MS, 05 à 20 de agosto de 2015. Duzentos juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* ($23 \pm 0,86$ g) em fase de transição alimentar suplementados previamente com probiótico *Bacillus subtilis* durante 30 dias , foram distribuídos em 20 caixas de fibra de 100 L (n= 20), com aeração e fluxo de água contínuo . A qualidade da água permaneceu na faixa adequada ao conforto dos peixes para o período de inverno : oxigênio dissolvido na água em $10,6 \pm 0,12$ mg L⁻¹, temperatura da água em $21,7 \pm 1,27$ °C e ph da água de $7,3 \pm 0,2$ (Kubitza et al., 1988).

Foram testados dois grupos experimentais desafiados com as concentrações 0,6

$\times 10^6$ e $0,9 \times 10^6$ UFC (Unidade formadora de Colônia) *A. hydrophila* cada grupo dividido em cinco tratamentos níveis de inclusão do probiótico na alimentação :

- controle (n = 20);
- 10 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20);
- 20 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n= 20);
- 30 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20);
- 40 g. Kg⁻¹ *B. subtilis* (n=20).

Cada animal foi considerado uma repetição.

Os peixes foram suplementados pelo período de 30 dias em uma piscicultura comercial localizada no distrito de Cachoeirão – MS , o plano nutricional consistia em uma ração farelada comercial contendo 41, 47 % Proteína bruta; 8,35 % Extrato etéreo; 90,38 % Matéria Seca; 3,96 % Fibra detergente ácido; 17,41 % Fibra detergente neutro e 9,62% Umidade; análise bromatologica da ração comercial foi realizada no laboratório comercial Mercolab Laboratórios Ltda, em Chapecó – SC. Foi acrescido a esta ração o coração bovino moído compondo assim a alimentação úmida dos juvenis no treinamento alimentar.

O probiótico comercial Calsporin® contendo *Bacillus subtilis* na concentração 10^9 UFC⁻¹ foi adicionado na ração comercial farelada por meio de veículo oleoso (2% de óleo de soja) para incorporação do probiótico.

A alimentação úmida com o probiótico , era ofertada 4 vezes durante o período noturno *ad libitum*, horário de maior atividades dos peixes; o protocolo realizado de treinamento alimentar foi o convencionalmente utilizado na piscicultura comercial.

- 6) Nível de inclusão 1: Controle , alimento úmido (ração farelada + coração bovino moído) isenta probiótico;
- 7) Nível de inclusão 2 : Alimento úmido + *B. subtilis* 10 g/Kg⁻¹ $\times 10^9$ UFC/g
- 8) Nível de inclusão 3: Alimento úmido + *B. subtilis* 20 $\times 10^9$ g/Kg⁻¹ UFC/g
- 9) Nível de inclusão 4: Alimento úmido + *B. subtilis* 30 $\times 10^9$ g/Kg⁻¹ UFC/g
- 10) Nível de inclusão 5: Alimento úmido + *B. subtilis* 40 $\times 10^9$ g/Kg⁻¹ UFC/g

Após este período de suplementação os juvenis de *P. reticulatum* foram transferidos para unidade experimental do laboratório de Sanidade de Peixes da UEMS, para o desafio.

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizadas no desafio bacteriano dos juvenis de *P. reticulatum* foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do

Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Para o preparo do material para o desafio, a bactéria *A. hydrophila* foi semeada em meio BHI (Brain Heart Infusion) Agar e incubada por 24 horas em estufa bacteriológica à 27 °C.

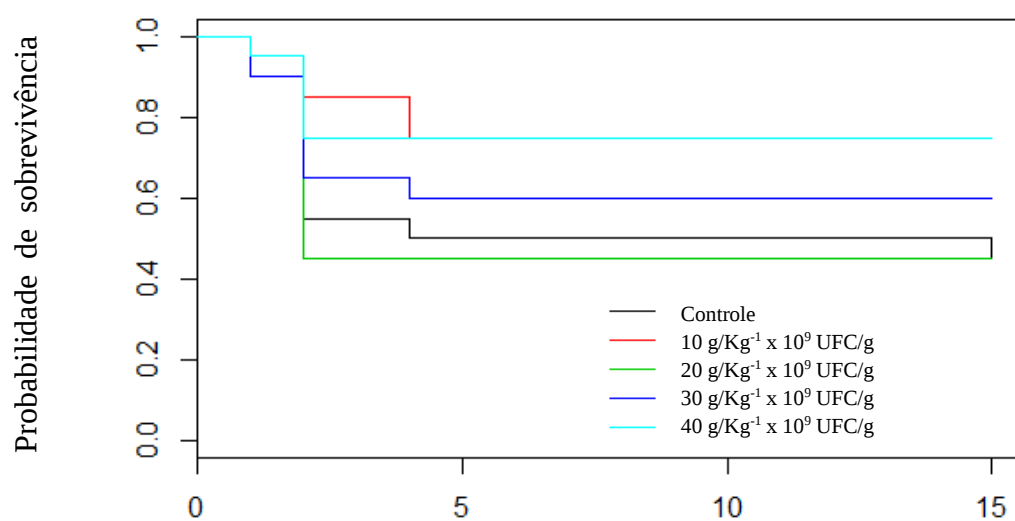
Com meio de cultura pronto todo o conteúdo foi realocado em microtubos esterilizados e centrifugados em centrífuga refrigerada a 4000g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os microtubos (2,5 ml) completados com PBS estéril e centrifugados novamente, onde o sobrenadante foi descartado. Os peletes formados foram realocados para um Becker contendo 200 ml de PBS (tampão fosfato esterilizado) e em seguida verificados a leitura do conteúdo no espectrofotômetro, para os valores de concentração de 0,6 e 0,9 x 10⁶ UFC/ml⁻¹.

Após o desafio bacteriano foram observadas a sobrevivência dos peixes e os sinais clínicos aparentes ocasionados por *A. hydrophila* após 24 e 48 horas e acompanhada as observações por mais 15 dias (Aly et al., 2008). O diagnóstico da infecção por *A. hydrophila* foi realizada por meio de sinais clínicos: petéquias ao longo de toda a superfície corporal; ascite; peixes isolados; coloração enegrecida e hemorragia nas nadadeiras e nos órgãos internos (Garcia e Moraes, 2009; Cipriano et al., 1984).

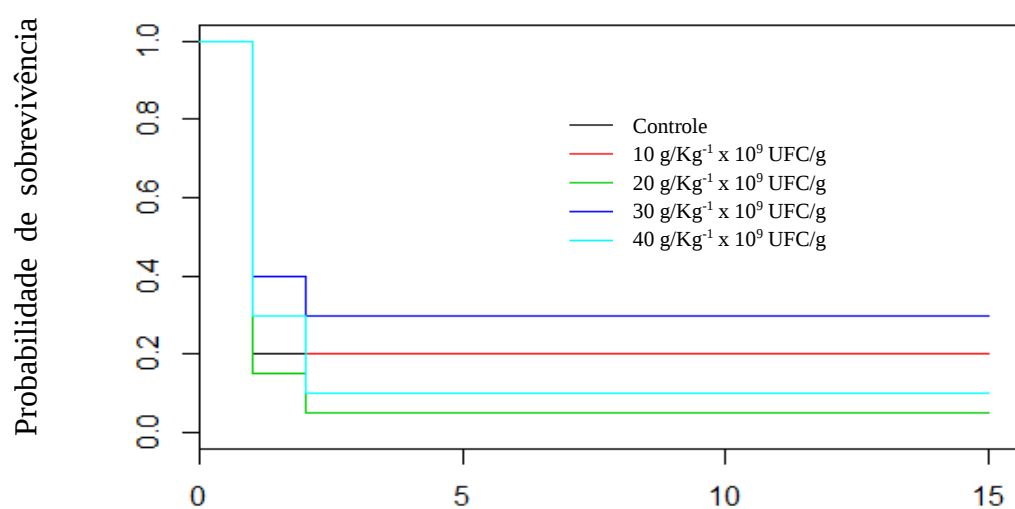
A sobrevivência pós-desafio bacteriano dos juvenis de *P. reticulatum* nos dois grupos desafiados com *A. hydrophila* e os diferentes níveis de inclusão de probiótico foram analisados pelo teste Kaplan Meier ou teste de sobrevivência, estimador não-paramétrico que utiliza dados quantitativos e apresenta gráficos com distribuição do tempo até ocorrer o evento desejado, no caso a morte dos peixes. As anotações dos dados para análise posterior foram feitas de forma que quando o peixe atingia o evento esperado (morte) foi feita a marcação 1, e quando o peixe não atingia o evento esperado usamos a censura 0; teste este submetido ao programa estatístico R studio versão 3.2.2 e verificado se as curvas de sobrevivência apresentavam diferença estatística significativa a 5 % .

Resultado e discussão

De acordo com as curvas de sobrevivência os resultados obtidos após o desafio bacteriano com *A. hydrophila* foi observado que não houve diferença significativa para a sobrevivência dos juvenis de *P. reticulatum* para os grupos tratados com probiótico *Bacillus subtilis* e o grupo controle (figura 1.).



Dias de observação pós-desafio com 0.6×10^6 UFC/ml⁻¹ de *A. hydrophila*



Dias de observação pós-desafio com 0.6×10^6 UFC/ml⁻¹ de *A. hydrophila*

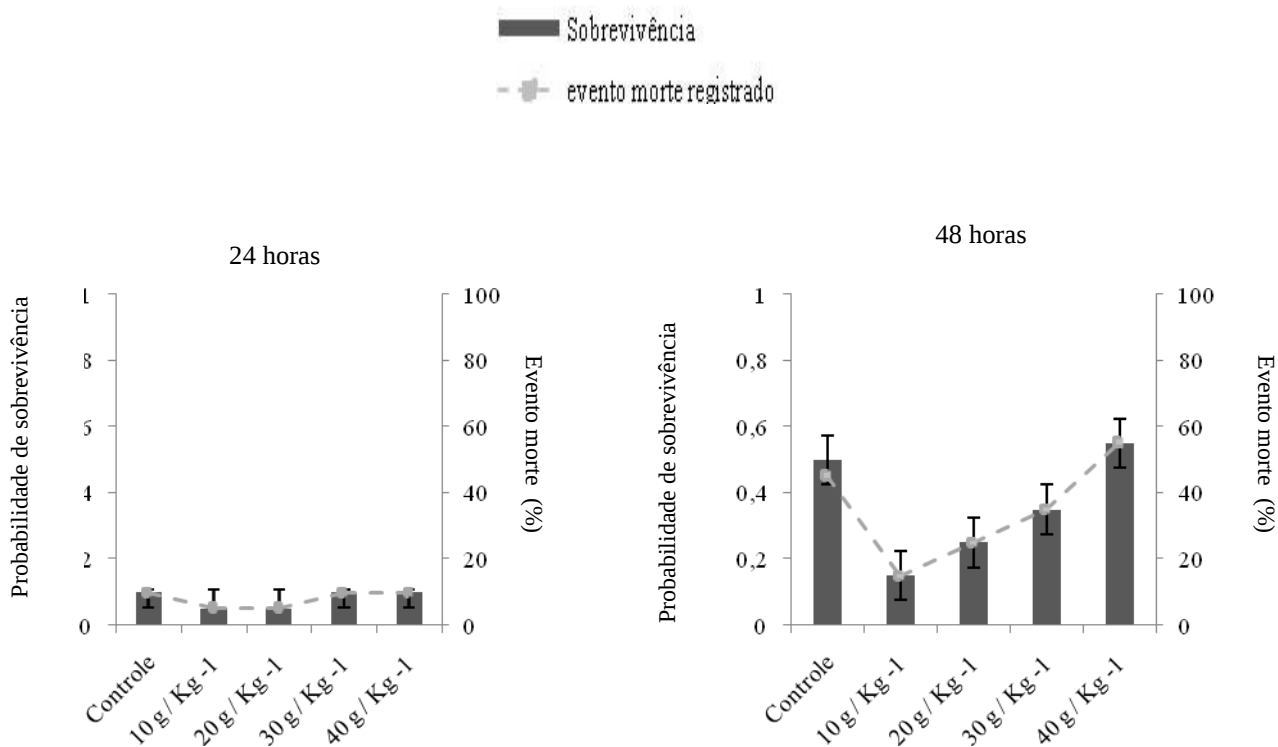
Figura 1. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier por níveis de inclusão do probiótico *B. subtilis* pós – desafio experimental

Os períodos onde foram registrados os maior número de indivíduos mortos ocorreram nos tempos 24 e 48 horas após a inoculação de *A. hydrophila* nas concentrações de 0,6

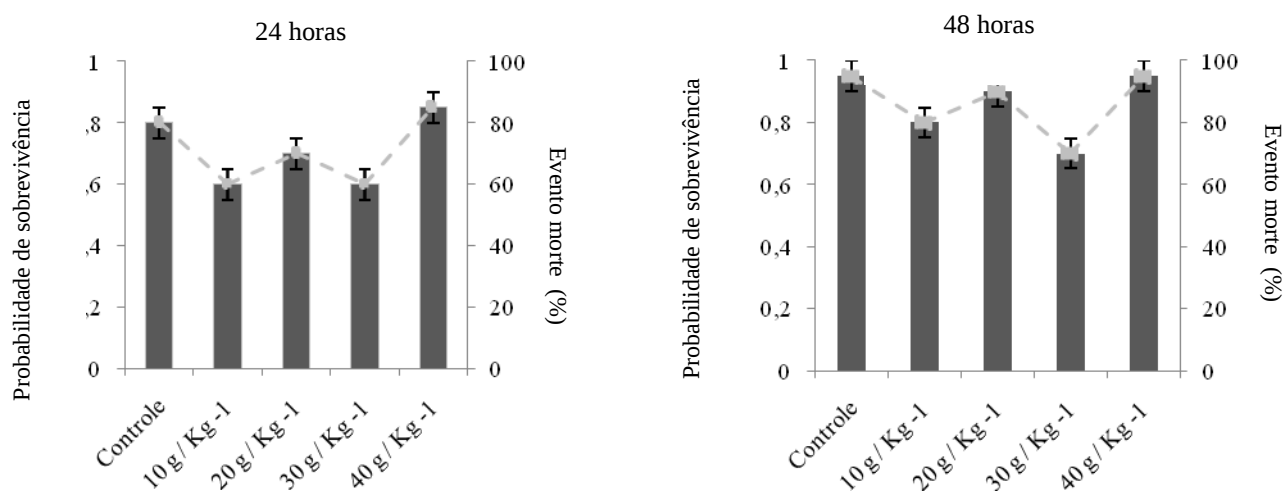
e $0,9 \times 10^6$ UFC/ml⁻¹. O grupo que foi desafiado com a menor concentração de *A. hydrophila* ($0,6 \times 10^6$ UFC/ml⁻¹) nas primeiras 24 horas após o desafio o número de indivíduos mortos registrados chegou a 10% no tratamento controle, 30 e 40 g/kg⁻¹ de probiótico; após 48 horas apenas o tratamento controle e 40 g/kg⁻¹ *B. subtilis* alcançaram o índice de 50 % de ocorrência do evento morte para esta concentração de inoculação de *A. hydrophila* (Figura 2). O grupo que foi desafiado com a concentração de $0,9 \times 10^6$ UFC/ml⁻¹ *A. hydrophila* no tempo de 24 horas foi registrados 80% de ocorrência do evento morte para o grupo controle e 40 g/kg⁻¹ *B. subtilis* , em 48 horas o registro de indivíduos mortos ultrapassava mais de 70% para todos os tratamentos (figura 2).

Nos peixes que vieram a óbito foram observados sinais clínicos aparentes de infecção por *A. hydrophila*, dentre eles: ascite (abdômen distendido), hemorragias nas nadadeiras pélvicas, hemorragia e inflamação do ânus, olhos saltados e de aspectos opacos, redução de atividade e nado letárgico corroborando com (Oliveira et al., 2014).

No nosso estudo o grupo que foi suplementado com a maior taxa de inclusão do probiótico (40 g. Kg⁻¹ x 10^9 UFC g⁻¹) foi observado taxas de sobrevivência semelhante ao grupo controle (isento de probiótico) no tempo de 24 horas de infecção. Resultados positivos foram observados em tilápia do Nilo após a suplementação durante 55 dias com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum* na dieta, onde os grupos suplementados com probiótico a mortalidade dos peixes foram menores do que 35%, enquanto a mortalidade do grupo controle foi de 56% (Cornélio et al., 2013). Farias et al., (2016) observou que após suplementar *Piaractus mesopotamicus* com diferentes níveis de inclusão de *Bacillus cereus* e *B. subtilis*, os grupos tratados apresentaram maior taxa de sobrevivência após o desafio com *A. hydrophila*, e concluíram que as maiores concentrações do probiótico para *P. mesopotamicus* ocasionaram supressão parcial das respostas imunológicas.



Níveis de inclusão de *B. subtilis* pós – desafio com $0,6 \times 10^6$ UFC/ml⁻¹ *A. hydrophila*



Níveis de inclusão de *B. subtilis* pós – desafio com $0,9 \times 10^6$ UFC/ml⁻¹ *A. hydrophila*

Figura 2-b. Probabilidade de sobrevivência e porcentagem de ocorrência do evento morte pós- desafio bacteriano nos tempos de 24 e 48 horas.

De acordo com Merrifield & Carnevali (2014) o período mais longo para recuperação do probiótico após cessar seu fornecimento na dieta dos peixes foram de três semanas relatados na literatura, mas a eficácia do probiótico para permanecer dentro do trato gastrointestinal dos peixes difere entre as espécies, com diferentes pressões seletivas do hospedeiro, diferentes condições de criação e a diferença de temperatura que pode interferir diretamente, pois temperaturas mais baixas são suscetíveis a reduzir taxas de multiplicação das bactérias probióticas. Este estudo foi realizado no período de inverno o que pode ter inibido a ação do probiótico após a interrupção do fornecimento durante o período de observação pós-infecção bacteriana.

O modo de ação do probiótico no caso do desafio bacteriano é no mecanismo de imunidade inata do organismo, onde as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal, formando assim uma barreira aos microorganismos patogênicos por exclusão competitiva, e se estabelecendo dentre os demais organismos ali presentes (Rodrigues et al., 2015), criando assim equilíbrio microbiano em favor da flora benéfica, possibilitando a redução do pH, com conseqüente redução de bactérias prejudiciais ao hospedeiro (Ribeiro et al., 2008).

Durante o período de transição alimentar o trato gastrointestinal dos juvenis é muito dinâmico, de acordo com Barbosa (2011) esta fase o comprimento do coeficiente do intestino podem aumentar como diminuir ao longo do condicionamento e sua plasticidade morfológica é maior em juvenis híbridos do que espécies nativas puras. Esta dinâmica pode ter dificultado a fixação do probiótico *B. subtilis* na mucosa intestinal e sua multiplicação durante o período estudado. Talvez melhores resultados poderiam ser obtidos através da suplementação com um simbiótico ; de acordo com Mouriño (2015) a razão para usa uma combinação simbiótica é que os simbióticos estimulam o crescimento do organismo probiótico fornecendo o substrato específico para bactéria para sua fermentação.

Conclusão

Estudos que concentram seus esforços em como complementar as dietas de peixes nativos com potencial promissores no setor produtivo, níveis de suplementação adequada de probióticos principalmente nas fases onde há o maior número de riscos de surtos de *Aeromonas hydrophila* como o período de treinamento alimentar , são

escassos na literatura. Este estudo se destaca por verificar que a suplementação durante o tempo de 30 dias e temperaturas mais baixas em uma piscicultura comercial com probiótico *Bacillus subtilis* na fase de treinamento alimentar é ineficaz para melhorar a taxa de sobrevivência dos juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* diante de um desafio bacteriano com *A. hydrophila*.

Referências

- Aly, S.M., Ahmed, Y.A., Abdel-aziz, A. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus* , as potential probiotics , on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections . **Fish & Shellfish Immunology**, v.25 p. 128–136. 2008. doi:10.1016/j.fsi.2008.03.013.
- Cipriano, R.C., Bullock, G.L., Pyle, S.W.. *Aeromona hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **Fish & Wildlife Publications** , paper 134, 1984.
- Cornélio, F.H.G., Ferreira, E.C., Borba, M.R., Mouriño, J.L.P., Fernandes, V.A.G., Fracalossi, D.M.. Crescimento , digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília, p. 863–870, 2013. doi:10.1590/S0100-204X2013000800008
- Cutting, S.M.. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**. v. 28, p.214–220 , 2011. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007
- Farias, T.H.V., Levy-Pereira, N., Alves, L. de O., Dias, D. de C., Tachibana, L., Pilarski, F., Belo, M.A. de A., Ranzani-Paiva, M.J.T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science Technology**, v.211, p.137–144, 2016. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004
- Ferreira, A.H.C., Araripe, M.N.B. de A., Monteiro, A.B., Lopes, J.B., Araripe, H.G. de A. Uso de probióticos na aquicultura – Revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.9 , p. 1965–1980, 2012. ISSUE: 1983- 9006.
- Garcia, F., Moraes, R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** . v. 31, p. 17–21, 2009. Doi:10.4025/actascibiolsci.v31i1.308
- Gastalho, S., Silva, G.J., Ramos, F.. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa** , v. 3, p. 29–45, 2014.
- Gatesoupe, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p. 147–165, 1999.
- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B. de, Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Russo, M.R., Carrijo-Mauad, J.R., Martins, M.L.. **Biologia e Estratégias na Sanidade de Alevinos de Bagres Carnívoros**. Embrapa agropecuária oeste 1, 2012.
- Kubitza, F., Campos, J.L., Brum, J.A. Produção Intensiva no PROJETO PACU Ltda.

AGROPEIXE Ltda. **Panorama da Aquicultura**, v. 8, p. 41–49, 1988.

Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R., Vani, T., Brahmachari, R.K., Nayak, S.K., Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on haematological and immunological parameters. **Aquaculture International**, 2015. doi:10.1007/s10499-015-9883-x

Merrifield, D.L., Carnevali, O., 2014. **Probiotic Modulation of the Gut Microbiota of Fish**. Aquaculture Nutrition. 1ª edição, cap. 8, p. 185 - 222, JohnWiley & Sons, Ltd. Published 2014. doi: 10.1002/9781118897263.ch8

Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Silva, B.C., Pereira, G. V., Jesus, G.F.A., Ushizima, T. T., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. Symbiotic supplementation on the hemato-immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Nutrition**, 2015. doi:10.1111/anu.12390

Oliveira, T.F., Tavares, G.C., Figueiredo, H.P.F., Leal, C.A.G. **Sanidade em Organismos Aquáticos. Cadernos Técnicos Veterinária e Zootecnia**. v. 73, p. 33–44, 2014.

Pandiyani, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R. Probiotics in aquaculture. **Drug Invention Today**, v. 5, p. 55–59, 2013. doi:10.1016/j.dit.2013.03.003

Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I. de, Balcázar, J.L. Probiotics in aquaculture: a current assessment. **Reviews in Aquaculture**, v.5, p. 1–14, 2013. doi:10.1111/raq.12033

Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E., Buchmann, K.. Short communication Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 495- 498, 2003.

Ravi, A. V, Musthafa, K.S., Jegathambal, G., Kathiresan, K., Pandian, S.K.. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 219–223, 2007. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02180.x

Ribeiro, P.A.P., Costa, L.S., Logato, P.V.R. Probióticos na aquicultura. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 6, p. 837–846, 2008. ISSN : 2027-4297

Rodrigues, R.B., Meurer, F., Boscolo, W.R. Additives in fish nutrition. **Revista Colombiana Ciencia Animal**, v. 7, p. 228–236, 2015.

Santos, L., Ramos, F. Analytical strategies for the detection and quantification and quantification antibiotic residues in aquaculture fishies: A review. **Trends Food Science Technology**, 2016. doi:10.1016/j.tifs.2016.03.015

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–19, 2016. doi:10.1111/raq.12164

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

Considerando que este período de condicionamento alimentar pode ser estressante para os juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* e nessa fase o canibalismo é natural, seria interessante poder controlar ao máximo o ambiente de cultivo desses peixes (temperatura, oxigênio, ph) com práticas de manejo adequadas que minimize os fatores estressantes no período de transição alimentar e administrar por um tempo mais prolongado o probiótico na alimentação ou em conjunto com um prebiótico poderia alcançar um efeito mais satisfatório para as variáveis analisadas.

Este estudo nos levar a sugerir que a inclusão de doses menores do probiótico *Bacillus subtilis* na dieta de juvenis de cachara seria vantajoso, pois foi observado que o maior nível de inclusão do probiótico na dieta testada neste trabalho não apresentou diferença significativa em todos os parâmetros analisados em comparação com os tratamentos que receberam doses menores, e a sobrevivência do grupo tratado com $40 \text{ g} \times 10^9 \text{ /kg}$ após o desafio foi menor do que os outros tratados com probiótico *Bacillus subtilis* e semelhante ao controle, pensando no setor produtivo doses menores seriam mais indicadas.