



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ-UESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LEONILDE XAVIER COSTA

SUPLEMENTAÇÃO COM ENDÓSPOROS PROBIÓTICOS (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*) NA DIETA DE JUVENIS DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*

**ILHÉUS –BA
2021**

LEONILDE XAVIER COSTA

SUPLEMENTAÇÃO COM ENDÓSPOROS PROBIÓTICOS (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*) NA DIETA DE JUVENIS DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Luís Gustavo Tavares Braga

Co-orientador: Wilson Barros Luiz

**ILHÉUS –BA
2021**

C837

Costa, Leonilde Xavier.

Suplementação com endósporos probióticos (Bacillus coagulans, Bacillus subtilis, Bacillus clausii) na dieta de juvenis de matrinxã, Brycon amazonicus / Leonilde Xavier Costa. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.

xii, 59f. : il.

Orientador: Luis Gustavo Tavares Braga.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências.

1. Alimentos funcionais. 2. Desempenho. 3. Histologia. 4. Peixes. 5. Sistema imune. I. Título.

CDD 613.2

LEONILDE XAVIER COSTA

SUPLEMENTAÇÃO COM ENDÓSPOROS PROBIÓTICOS (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*) NA DIETA DE JUVENIS DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*

Ilhéus-BA, 30/07/2021

Luís Gustavo Braga- DS
UESC
(Orientador)

Wilson Barros Luiz- DS
UESC
(Co-orientador)

José Fernando Bibiano de Melo
UNIVASF

Giovanni Vitti Moro
EMBRAPA

ILHÉUS –BA
2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus e à minha filha Catharina.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu pai, amigo e abrigo! Que sempre me ouviu e me acolheu em seus braços.

Ao professor Luís Gustavo por aceitar me orientar no mestrado, pela paciência e oportunidade de aprender com ele durante esse período.

Ao professor Wilson Barros pela co-orientação, pelos momentos de alegria, aprendizado e leveza que me proporcionou.

Aos membros da banca de defesa, pelas valiosas contribuições ao trabalho e à minha formação neste momento tão importante.

À minha família que foi meu alicerce durante todo esse período desafiador. Em especial ao meu esposo, minha filha, minhas irmãs, meu pai e minha mãe. Meu infinito amor por vocês!

À Darlene Pereira e Carminha (*in memoriam*) minhas incentivadoras de vida, amo vocês!

À equipe AQUANUT, pela parceria durante todo esse tempo. Um agradecimento especial à Mariani Schorer, Virgínia, Mariana, Karina, Thiago e Alan.

À Paula, Gabi Mota e Ivo pelo auxílio que me foi oferecido em algumas análises.

À equipe do LAPAGEN que me acolheu e ajudou em todos os momentos que precisei, em especial à Renata e Mariana.

À Cláudia e Alaor pelo carinho e incentivo de sempre.

Aos meus amigos, em especial Virgínia Cardoso, Krizia, Rafaela, Gislene, Bianca, Sandra e Tathiane.

À universidade Estadual de Santa Cruz, a todos os funcionários e professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela grandiosa oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Todo o meu amor aos que me ajudaram a manter a sanidade mesmo quando parecia impossível.

SUPLEMENTAÇÃO COM ENDÓSPOROS PROBIÓTICOS (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*) NA DIETA DE JUVENIS DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*

RESUMO

A aquicultura está entre os setores que vem se destacando na produção animal, e com isso se faz necessário que o seu desenvolvimento seja baseado em questões de sustentabilidade, visando mitigar os impactos ambientais causados pela intensificação dos sistemas produtivos. Neste sentido, objetivou-se avaliar o efeito de três cepas probióticas de bactérias do gênero *Bacillus* sobre o desempenho zootécnico, hematologia, histologia, bem como parâmetros microbiológicos no intestino e nas fezes de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) e submetidos a desafio de estresse por captura. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus- BA no período de abril a maio de 2021. Foram avaliados 244 peixes juvenis, distribuídos aleatoriamente em 16 tanques de polietileno de 310 L. O experimento contou com quatro tratamentos (TC- Controle: ração sem adição de probiótico; TBS- *Bacillus subtilis* 1×10^{13} UFC por kg^{-1} de ração; TBC- *Bacillus coagulans* 1×10^{13} UFC por kg^{-1} de ração; TBCL- *Bacillus clausii* 1×10^{13} UFC por kg^{-1} de ração) e quatro repetições. Os resultados demonstraram que a suplementação probiótica influenciou a histomorfometria intestinal dos peixes. Não foram observados efeitos sobre parâmetros de desempenho e da resposta ao estresse dos juvenis de matrinxã suplementados com diferentes probióticos.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Desempenho. Histologia. Peixes nativos. Sistema imune.

SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTIC ENDOSPORE (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*) IN THE JUVENILE DIET OF MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*

ABSTRACT

Aquaculture is among the sectors that have been standing out in animal production, and its development needs to be based on sustainability issues, aiming to mitigate the environmental impacts caused by the intensification of production systems. In this sense, the objective was to evaluate the effect of three probiotic strains of *Bacillus* genus bacteria on zootechnical performance, hematology, histology, as well as microbiological parameters in the intestine and feces of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles submitted to stress challenge by capture. The experiment was conducted at the State University of Santa Cruz (UESC), in Ilhéus-BA, from April to May 2021. 244 juvenile fish were evaluated, randomly distributed in 16 310 L polyethylene tanks. The experiment had four treatments (TC- Control: feed without added probiotic; TBS- *Bacillus subtilis* 1×10^{13} CFU per kg^{-1} of feed; TBC- *Bacillus coagulans* 1×10^{13} CFU per kg^{-1} of feed; TBCL- *Bacillus clausii* 1×10^{13} CFU per kg^{-1} of ration) and four repetitions. The results showed that probiotic supplementation influenced the intestinal histomorphometry of fish. There were no effects on performance parameters and stress response of matrinxã juveniles supplemented with different probiotics.

Key words: Functional foods. Performance. Histology. Native fish. Imune system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais espécies produzidas no Brasil. Fonte: IBGE (2020).	17
Figura 2. Matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> . Fonte: Autor.	18
Figura 3. Meios de cultura de bactérias probióticas. A) Pré-inóculo de bactérias probióticas; B) Endósporo de bactérias probióticas após cultivo e centrifugação; C) Placa de petri com microrganismos probióticos evidenciando a contagem de unidade formadoras de colônias (UFC). Fonte: Autor.	31
Figura 4. Processamento da ração experimental. A) Peletização; B) Inoculação do probiótico por meio de aspersão. Fonte: Autor.	32
Figura 5. Juvenis de matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>) submetidos à desafio de estresse por captura. Fonte: Autor.	35
Figura 6. Coleta de sangue por meio de punção vaso caudal de juvenis de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> . Fonte: Autor.	36
Figura 7. Juvenil de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> , evidenciando a remoção do aparelho digestório. Fonte: Autor.	37
Figura 8. Variação da eliminação (12 horas) de probiótico pelas fezes de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> , suplementados com probióticos durante 35 dias. Legenda: TC=Controle; TBS= <i>B. subtilis</i> ; TBC= <i>B. coagulans</i> ; TBCL= <i>B. clausii</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional da dieta basal de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> , para os diferentes probióticos utilizados.....	32
Tabela 2. Quantificação microbiológica (UFC g ⁻¹) realizada nas rações experimentais no período 1-35 dias.....	40
Tabela 3. Desempenho zootécnico (média ± desvio padrão) de juvenis de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> , alimentados com diferentes probióticos durante 35 dias.....	41
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos do sangue de juvenis de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> , alimentados com rações contendo diferentes probióticos (<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i>) e submetidos ao desafio de estresse por captura.....	43
Tabela 5. Parâmetros hematológicos de juvenis de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i> , alimentados com rações contendo diferentes probióticos (<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i>) e submetidos ao desafio de estresse de captura.....	44
Tabela 6. Comprimento de microvilosidades intestinais (média ± desvio padrão) de juvenis de matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>) alimentados com dietas suplementadas com <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> e <i>Bacillus clausii</i> por 35 dias.....	46
Tabela 7. Concentração probiótica (UFC g ⁻¹) do intestino de juvenis de matrinxã, <i>Brycon amazônico</i> , suplementados com diferentes probióticos (<i>B. subtilis</i> , <i>B. Coagulans</i> , <i>B. clausii</i>) durante 35 dias.....	48
Tabela 8. Concentração probiótica média (UFC g ⁻¹) do intestino e fezes de juvenis de matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>) suplementados com diferentes microrganismos probióticos.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Trabalhos desenvolvidos a partir da suplementação probiótica e seus efeitos em espécies de peixes	20
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO GERAL	15
2.1	Objetivos Específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Aquicultura.....	16
3.2	Matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	17
3.3	Aditivos em Aquicultura.....	18
3.4	Probióticos	21
3.5	Mecanismos de Ação	23
3.6	<i>Bacillus</i>	24
3.6.1	<i>Bacillus clausii</i>	25
3.6.2	<i>Bacillus coagulans</i>	25
3.6.3	<i>Bacillus subtilis</i>	26
3.7	Sistema Imune de Peixes	26
3.8	Hematologia dos Peixes e Probióticos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Delineamento Experimental.....	29
4.2	Produção das Rações Experimentais e dos Microrganismos.....	29
4.2.1	Preparação dos Microrganismos Probióticos: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> e <i>Bacillus clausii</i>	29
4.2.2	Processamento da Ração	31
4.2.3	Análise Qualitativa e Quantitativa da Ração	33
4.3	Desempenho Zootécnico.....	33
4.4	Desafio de Estresse por Captura	34
4.5	Parâmetros Hematológicos	35
4.6	Histomorfometria Intestinal	36
4.7	Parâmetros Microbiológicos do Aparelho Digestório	37
4.8	Parâmetros Microbiológicos das Fezes.....	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	Desempenho Zootécnico.....	40
5.2	Desafio de Estresse por Captura	42
5.2.1	Parâmetros Hematológicos.....	42
5.3	Histomorfometria Intestinal	46
5.4	Parâmetros Microbiológicos do Aparelho Digestório	47
5.5	Parâmetros Microbiológicos das Fezes.....	48
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial pela produção de alimentos tem fundamentado a necessidade de pesquisas voltadas para o desenvolvimento sustentável dos sistemas de produção e a aquicultura tem se destacado, devido à sua potencialidade (SIQUEIRA, 2018).

Com a intensificação dos sistemas de produção de peixes se faz necessário uma atenção especial quanto à sanidade e desenvolvimento destes animais (CASTRO *et al.*, 2021). O uso de antibióticos na profilaxia e prevenção de doenças, bem como promotores de crescimento, têm sido criticado e com isso a busca por alternativas que atendam à demanda por produtividade visando a sustentabilidade necessitam ser desenvolvidas (RINGØ, 2020).

Nos últimos anos tem se intensificado as pesquisas voltadas aos alimentos funcionais com intuito de minimizar o uso de antibióticos (BHARATI *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2018; RAHMAN, 2019). Neste cenário surgem os probióticos, como alternativas para a mitigação de impactos ambientais da atividade aquícola (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019).

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios aos seus hospedeiros (FAO/WHO, 2002). Atuam direta ou indiretamente na composição da microbiota, competindo por sítios de adesão, secretam substâncias com ação antimicrobiana e/ou alterando o microambiente, promovendo maturação do sistema imunológico de diversos animais e também contribuindo para uma melhor conversão alimentar, influenciando o desempenho do crescimento, utilização da ração e condições fisiológicas dos animais (JESUS *et al.*, 2016).

Para serem considerados como probióticos os microrganismos devem apresentar algumas características, tais como: capacidade de modulação da microbiota intestinal, produção de substâncias antimicrobianas, resistência a baixos níveis de pH, sais biliares e enzimas, capacidade de se aderir a mucosa intestinal, além de sobreviver e se multiplicar no trato gastrointestinal (DAWOOD *et al.*, 2019a). Devem ser seguros

não apenas para os animais cultivados e o meio onde vivem, mas também para os seres humanos (JESUS *et al.*, 2016).

Muitas cepas de bactérias do gênero *Bacillus* sp. são atualmente usados como suplementos dietéticos probióticos na alimentação humana e em rações para animais. *Bacillus* é um gênero de bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbicas facultativas formadoras de endósporos (BERNARDEAU *et al.*, 2017). A capacidade de formar endósporos é comercialmente atraente permitindo o armazenamento a longo prazo sem perda de viabilidade em comparação com aqueles que contêm bactérias não formadoras de endósporos (ALVES *et al.*, 2018; CUTTING, 2011). Além disso, os endósporos são capazes de sobreviver ao pH estomacal e podem atingir o intestino delgado para exercer suas propriedades probióticas (RINGØ, 2020).

Diversos estudos têm sido realizados utilizando microrganismos probióticos na alimentação de peixes, com resultados promissores quanto ao desempenho de crescimento e estimulação do sistema imunológico destes animais (ASADUZZAMAN *et al.*, 2018; DAWOOD; ABO-AL-ELA; HASAN, 2020; DUTTA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; MEIDONG *et al.*, 2018)

Diante disso, ao escolher um probiótico deve-se avaliar: o cultivo, a estabilidade e a administração da cepa probiótica, assim como deve ser observado o manejo da criação e os hábitos alimentares dos animais, para que seja selecionado o mais adequado para o sistema de produção (JESUS *et al.*, 2016).

2 OBJETIVO GERAL

Objetivou-se avaliar o efeito de três cepas probióticas de bactérias do gênero *Bacillus* sobre o desempenho zootécnico, hematologia, histologia, bem como parâmetros microbiológicos no intestino e nas fezes de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) suplementados durante 35 dias e submetidos a desafio de estresse por captura.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a viabilidade dos endósporos incorporados nas rações experimentais;
- ✓ Avaliar os efeitos da suplementação probiótica nos parâmetros de desempenho produtivo;
- ✓ Avaliar o efeito da suplementação probiótica sob estresse por captura por meio de análises hematológicas;
- ✓ Analisar a histologia do tecido intestinal dos peixes após a suplementação probiótica;
- ✓ Avaliar parâmetros microbiológicos do intestino após suplementação probiótica;
- ✓ Avaliar parâmetros microbiológicos nas fezes após suplementação probiótica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aquicultura

A busca por alimentos produzidos de forma sustentável aumentou consideravelmente nos últimos anos, o que torna necessário o desenvolvimento de atividades que atendam a esta demanda mundial (BRABO *et al.*, 2016). Também chamada de “*Blue Revolution*” devido aos seus impactos econômicos e sociais positivos, proporcionando por meio de seus avanços subsídios para desenvolvimento sustentável da atividade, a aquicultura tem se destacado pelos sistemas de criação intensivos ou semi-intensivos (SIQUEIRA, 2018).

Existe concomitantemente na indústria mundial de pescado dois sistemas: a pesca extrativista e aquicultura. O extrativismo se refere à captura de recursos pesqueiros marinhos, estuarianos e continentais e a aquicultura compreende o cultivo tanto de espécies de ambiente marinho, quanto dulcícolas (FARIAS; FARIAS, 2018).

A alta produtividade dos sistemas aquícolas, bem como a boa aceitabilidade do produto final confere expectativas de crescimento deste setor. O crescimento populacional e a busca por alimentos mais saudáveis têm acarretado a um aumento na procura de produtos oriundos dos setores aquícolas (BRABO *et al.*, 2016; SIQUEIRA, 2018).

No que diz respeito à potencialidade para desenvolvimento da aquicultura, o Brasil tem se destacado quando comparado aos principais países produtores, devido a sua disponibilidade hídrica, clima tropical, diversidade de espécies cultivadas, tecnologias e suas perspectivas (BRABO *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2020). Segundo Associação Brasileira de Piscicultura (2020), a piscicultura nacional cresceu 4,9% no ano de 2019, alcançando 758.006 toneladas no mesmo ano, enquanto que as demais proteínas animais mantiveram-se estáveis em seus valores de produção. Cerca de 64 espécies são cultivadas na aquicultura brasileira. Dessas espécies a tilápia e peixes redondos lideram o ranking (figura 1). Sendo estes dois grupos responsáveis por 83% da piscicultura no país (CALIXTO *et al.*, 2020; SCHULTER; FILHO, 2017).

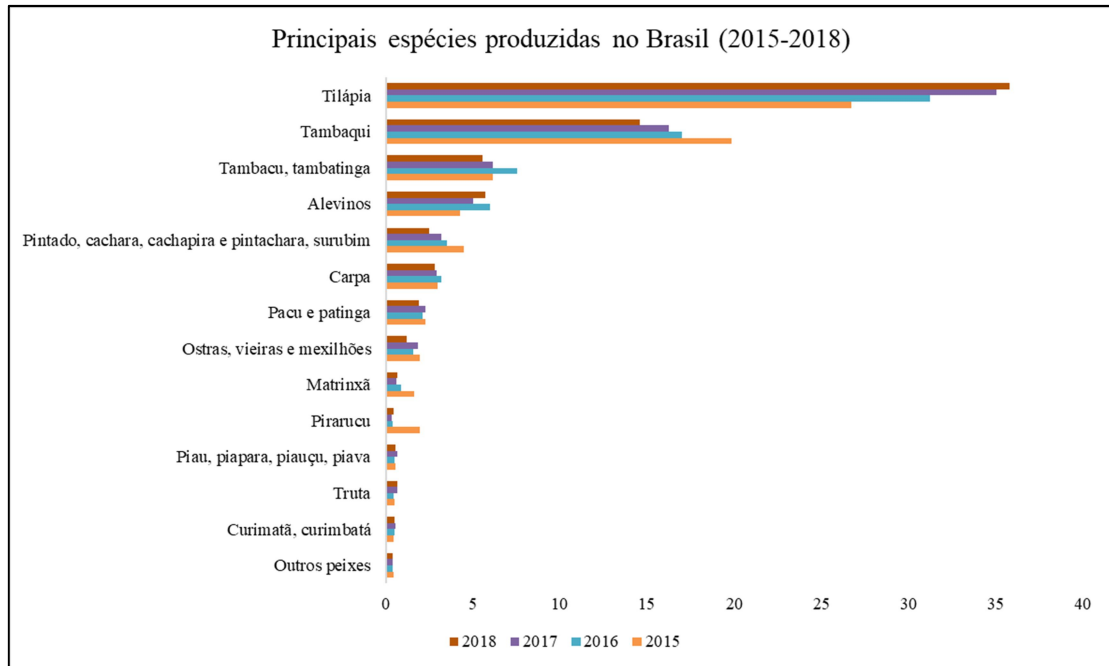


Figura 1. Principais espécies produzidas no Brasil. **Fonte:** IBGE (2020).

Nos últimos anos tem-se observado crescimento na produção de espécies nativas, chegando a ultrapassar a produção de espécies exóticas em alguns países sul-americanos (Peru, Chile e Brasil) (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2018). As espécies nativas já chegaram a contribuir com até 40% da produção total da aquicultura, e em 2014 atingiram quase 400.000 MT (SAINT-PAUL, 2017). Entretanto ainda segundo este autor, estudos relacionados à biologia, ecologia, nutrição e reprodução tem caminhado à passos largos para essas espécies. Ao final da década de 1970 surgiram os primeiros estudos relacionados à biologia e ecologia destas espécies, principalmente na Amazônia, bacias do Paraná e São Francisco e a partir de então chamou-se atenção para os impactos ecológicos de espécies invasoras (KUBITZA, 2016; SAINT-PAUL, 2017). Portanto, as espécies nativas podem contribuir para a acessibilidade da população e conseqüente consumo de pescado, aliado à sustentabilidade do setor (SAINT-PAUL, 2017).

3.2 Matrinxã, *Brycon amazonicus*

A espécie, matrinxã, *Brycon amazonicus*, pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Bryconinae (figura 2) (LEITE, 2019). Conhecido popularmente como jatuarana, jaturana, piabanha e pirabinha. Este

teleósteo pode atingir cerca de 40 cm e encontra-se distribuído na Bacia amazônica. Apresentam dentes multicuspidados, dispostos em fileiras nas maxilas superior (3 a 4) e inferior (2). De coloração cinza-amarelada, sendo o seu ventre mais claro, e suas escamas com bordas escurecidas e com linhas contínuas e sinuosas, apresenta uma mancha arredondada escura na região umeral (NASCIMENTO *et al.*, 2020). No aspecto reprodutivo, são peixes reofílicos, ou seja, realizam migração para se reproduzir. Possui hábito alimentar onívoro, e quando em ambientes de cultivo, possui boa aceitabilidade à ração industrial, grãos, frutos e subprodutos agrícolas (ARAÚJO-DAIRIKI; CHAVES; DAIRIKI, 2018). Se bem manejados, em condições favoráveis podem atingir de 700 a 1000 g de peso no primeiro ano de cultivo (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

O matrinxã é apreciado pelos piscicultores por apresentarem carne de excelente qualidade, facilidade de reprodução induzida, bom crescimento em ambiente de cultivo, além de manejo relativamente fácil em cativeiro, de boa adaptação, resistindo bem em águas mais frias e ácidas. Apresenta características apropriadas para pesca esportiva, devido à sua agressividade (SILVA *et al.*, 2016). Diante disso, é uma espécie que possui boa aceitabilidade de mercado, desempenhando papel relevante na economia no norte do Brasil e na piscicultura nacional (ARAÚJO-DAIRIKI; CHAVES; DAIRIKI, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2020).



Figura 2. Matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Fonte:** Autor.

No que diz respeito às exigências nutricionais, foi relatado que 40% de Proteína Bruta na dieta resultou em melhores índices de desempenho zootécnico (GONÇALVES *et al.*, 2021; LEITE, 2019).

3.3 Aditivos em Aquicultura

Na aquicultura um dos fatores determinantes para o sucesso da produção é a nutrição. Este fator é responsável pela capacidade das espécies de peixes em exibir o potencial genético de crescimento, uma vez que, aspectos como qualidade da ração, granulometria, frequência de alimentação e densidade de estocagem influenciam diretamente na produtividade (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018). Os custos com alimentação neste setor podem chegar de 50 a 80% (BHARATI *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, tem-se buscado atingir um sistema de produção mais sustentável, e com isso os aditivos alimentares funcionais têm surgido com a proposta de elevar a produtividade, conferindo melhor resistência a doenças infecciosas (BHARATI *et al.*, 2019). Diante da proibição ou redução na utilização de antibióticos nos sistemas aquícolas, entender os mecanismos de ação dos diversos aditivos que vem sendo utilizados como possíveis substitutos destes fármacos poderá levar ao desenvolvimento de alternativas que irão diminuir o uso de antibióticos e quimioterápicos na aquicultura (BHARATI *et al.*, 2019; DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018).

Segundo a Instrução Normativa 13/2004 (MAPA, 2004) entende-se por aditivos a substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano.

Os aditivos funcionais são alternativas que propiciam melhora na taxa de conversão alimentar, qualidade da ração, melhor eficiência na digestão dos componentes da dieta, crescimento, estímulo do sistema imune, modulação da microbiota intestinal e liga substâncias tóxicas no trato gastrointestinal, induzem funções fisiológicas (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018; BHARATI *et al.*, 2019). Dentre os aditivos funcionais que vem sendo utilizados estão os probióticos, que tem se apresentado promissores devido aos seus efeitos positivos observados (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018; BHARATI *et al.*, 2019;

DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018). Alguns trabalhos desenvolvidos nesta temática podem ser observados no quadro abaixo:

Quadro 1. Trabalhos desenvolvidos a partir da suplementação probiótica e seus efeitos em espécies de peixes

Probiótico	Efeito	Espécie	Referência
<i>Bacillus pumilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento no ganho de peso, taxa de crescimento específico, e eficiência da alimentação; • Aumento das respostas imunitárias não específicas. 	<i>Trachinotus ovatus</i>	Liu <i>et al.</i> , 2020
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de adsorção de Aflatoxina B₁. 	<i>Colossoma macropomum</i>	Pinheiro <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus velezensis</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da imunidade da mucosa, morfologia intestinal, atividade de enzimas digestivas intestinais, microbioma intestinal; • Resistência contra a infecção por <i>A. hydrophila</i>. 	<i>Oreochromis niloticus</i>	Kuebutorny <i>e et al.</i> , 2020
<i>Bacillus velezensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Melhora no crescimento; • Redução na eutrofização da água nos tanques. 	<i>Ictalurus punctatus</i>	ThurLOW <i>et al.</i> , 2019
<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Melhoria no desempenho de crescimento; • Aumento na digestão endógena; • Aumento nos parâmetros de imunidade inata; • Melhoria da microbiota intestinal; • Utilização da ração. 	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tan; Chen; Hu, 2019
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. mycoides</i> e <i>B. megatherium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Melhoria no desempenho; • Consumo de ração; • Sobrevivência. 	<i>Oreochromis niloticus</i>	Brito <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus cereus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento de <i>A. hydrophila</i>; • Aumento na taxa de crescimento específico 	<i>Clarias batrachus</i>	Dey; Ghosh; Hazra, 2018

	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento na Sobrevivência; • Aumento do conteúdo de RNA na carcaça. 		
<i>Bacillus licheniformis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Melhoria no crescimento • Aumento no conteúdo de proteína total do soro e do muco cutâneo; • Aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO); • Aumento na atividade de lisozima sérica; • Produção de espécies reativas a oxigênio (ROS) e espécies reativas a nitrogênio (RNS); • Aumento na atividade de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx); • Melhora na sobrevivência. 	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Gobi <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição contra patógenos; • Viabilidade no sistema digestivo; • Melhora no crescimento. 	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Interaminense <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do estresse; • Aumento do número de células sanguíneas; • Aumento da atividade da lisozima; • Modulação imunológica. 	<i>Labeo rohita</i>	Nandi <i>et al.</i> , 2017
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Imunomodulação. 	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Panigrahi; Viswanath; Satoh, 2011

3.4 Probióticos

Questões ambientais têm se tornado o ponto crítico da maioria das cadeias produtivas. Nesse sentido, a exploração de recursos naturais requer maior atenção, visto que a forma pela qual a atividade é desenvolvida pode ameaçar várias espécies, colocando em risco a si mesma (SIQUEIRA, 2018). A mitigação de riscos ambientais é uma tendência, que visa o aperfeiçoamento dos modelos de produção, fazendo-se necessário planos e certificações ambientais, a fim de tornar os sistemas de produção

mais sustentáveis, quanto à sua localização e parâmetros técnicos (CALIXTO *et al.*, 2020). A utilização adequada de antibióticos e a consequente substituição por probióticos, o uso da ração e o tratamento de resíduos, tem destaque neste cenário para o desenvolvimento de uma atividade mais sustentável (SIQUEIRA, 2018).

Historicamente, as primeiras sugestões do uso de bactérias probióticas foram dadas por Henry Tissier (1906) e Eli Metchnikoff (1907) e estes autores sugeriram que as utilizações destas bactérias promoveriam restauração da flora intestinal de seus pacientes. Apesar destes achados, só em 1965 Lilly e Stillwell chegaram a uma definição para o termo probiótico. Para estes autores probióticos seriam toda substância produzida por microrganismos capazes de promover o crescimento de outros microrganismos. Posteriormente, Fuller (1989) identificou a natureza microbiana dos probióticos e redefiniu a palavra como “suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando seu equilíbrio intestinal”. Este conceito continuou evoluindo e os probióticos foram definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Na aquicultura os probióticos se tornam importantes aliados, por possuírem a capacidade de promover ou melhorar a saúde dos animais, estimulando a resposta imunológica e inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (BRITO *et al.*, 2019). Com isso é possível se alcançar melhorias nutricionais e na qualidade do ambiente de cultivo, pois ocorrem modificações nos microrganismos associados ao hospedeiro, a partir da utilização de bactérias não patogênicas (DAWOOD *et al.*, 2019b).

Para que um microrganismo seja utilizado como probiótico, este deve atender alguns requisitos em meio à sua utilização, tais como: boa atividade microbiana e segurança, não só para os animais e o meio ao qual estão inseridos, mas também para os seres humanos (DAWOOD *et al.*, 2019a). Devem possuir capacidade de colonização permanente ou temporária do aparelho digestório, produzindo benefícios ao hospedeiro, ser inócuo, serem viáveis quanto ao tempo de armazenamento e transporte, ter resistências às enzimas digestivas e à bile, possuir propriedades

antimutagênicas e anticancerígenas e ainda não serem resistentes a antibióticos (JESUS *et al.*, 2016).

A partir do uso de probióticos é possível observar benefícios relacionados à sua administração, tais como: produção de substâncias químicas inibidoras, melhoria na resposta imune, competição por locais de adesão e por alimentos com patógenos na superfície do epitélio intestinal (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018), secreção de enzimas que auxiliam na degradação de alimentos melhorando, desse modo, a digestão e absorção de nutrientes, podendo ainda favorecer a qualidade da água do ambiente de cultivo (DAWOOD; ABO-AL-ELA; HASAN, 2020).

Apesar dos avanços no uso de probióticos na alimentação animal, constantemente se fazem necessários novos estudos (DAWOOD *et al.*, 2019b). Uma vez que, um candidato probiótico pode apresentar efeitos benéficos para uma determinada espécie de peixe, mas pode não apresentar efeitos satisfatórios em outra espécie. Isto porque, os aspectos fisiológicos e físico-químicos de determinado hospedeiro ou ambiente influenciam nas propriedades probióticas dos microrganismos, afetando conseqüentemente sua eficiência (ASADUZZAMAN *et al.*, 2018).

3.5 Mecanismos de Ação

No que diz respeito aos mecanismos de ação dos probióticos, estes ainda necessitam ser melhor elucidados (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018). Contudo, sabe-se que estes microrganismos contribuem com o desenvolvimento de células capazes de produzir metabólitos e enzimas, auxiliando na digestão de alimentos e absorção de nutrientes, antagonismo entre patógenos, influenciando na colonização e adesão destes microrganismos, bem como nas respostas imunológicas do hospedeiro (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018; PANDIYAN; BALARAMAN; THIRUNAVUKKARASU, 2013).

Em organismos aquáticos os probióticos desempenham três papéis principais: colonização da microbiota intestinal, exclusão competitiva e imunomodulação. Em contato com o trato digestivo, os mesmos ocupam e colonizam o epitélio da mucosa, aderindo-se e promovendo o crescimento do muco intestinal (DAWOOD; KOSHIO; ESTEBAN, 2018). Entende-se como efeito primário probiótico a competição por

receptores de adesão com organismos patogênicos, reduzindo a sua capacidade e/ou efeitos antagônicos (HAI, 2015). Por meio da exclusão competitiva é possível obter alguns produtos probióticos, que compreendem: microbiota estável, íntegra e controlada em culturas (BHARATI *et al.*, 2019). Isso é possível graças às diferentes estratégias de adesão dos microrganismos aos locais de fixação, sendo elas, interações hidrofóbicas, eletrostáticas, forças passivas e esféricas, ácidos lipoteicóicos, bem como aderências e estruturas próprias de adesão (PANDIYAN; BALARAMAN; THIRUNAVUKKARASU, 2013).

Quanto à influência dos probióticos no sistema imune de peixes, estes atuam melhorando a imunidade destes animais, visto vez que ocorre aumento da atividade dos macrófagos e do nível de anticorpos, tornando-os mais resistentes às doenças (RINGØ, 2020). Desse modo, os probióticos se tornam importantes aliados ao uso profilático de antibióticos e outros fármacos. Estes microrganismos competem por produtos químicos, nutrientes, oxigênio, entre outros compostos, melhorando a saúde e o sistema imune dos animais hospedeiros, bem como o desempenho zootécnico e qualidade de água (HAI, 2015).

Os *Lactobacillus* spp. e *Bacillus* spp. têm sido os tipos de probióticos mais explorados em aquicultura e um destaque especial tem se dado aos *Bacillus* (BERNARDEAU *et al.*, 2017). Estes microrganismos possuem capacidade de formar endósporos e com isso se tornam resistentes a temperaturas elevadas, alterações do pH, radiação e a agentes químicos, o que os torna excelentes opções dentro do processamento de ração (ABARIKE *et al.*, 2018; AMOAH *et al.*, 2019; BRUFAU; ESTEVE; TARRADAS, 2015; DE ARAÚJO *et al.*, 2018; GENG *et al.*, 2012).

3.6 *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas, em bastonete que normalmente se movem por flagelos peritricosos, podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos (KHATRI *et al.*, 2016). Possuem ainda capacidade de formar endósporos, o que as tornam mais resistentes a situações extremas, como calor, secagem, desinfetantes, condições intestinais, entre outros, proporcionando a estes microrganismos uma das formas de vida mais resistentes conhecida (BERNARDEAU

et al., 2017). Outra característica é que cada célula possui um endósporo e o processo de esporulação não é inibido pela exposição ao ar. Estes podem ser cilíndricos, redondos, ovais ou em forma de rim (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019). A maioria dos probióticos comerciais baseados em *Bacillus* consiste em *B. subtilis*, *B. polyfermenticus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. pumilus* e *B. licheniformis*. Os quais possuem a característica em comum de germinar, multiplicar e contribuir para a modulação das condições intestinais (BERNARDEAU *et al.*, 2017).

3.6.1 *Bacillus clausii*

Estes microrganismos apresentam significativa tolerância ao ambiente gastrointestinal e capacidade de colonização, mesmo na presença de antibióticos e antagonismo a bactérias patogênicas. Sabe-se ainda que *B. clausii* são capazes de inibir efeito citotóxico induzido por toxinas *Clostridium difficile* e *B. cereus* (IANIRO *et al.*, 2018; KHATRI; SHARMA; SUBRAMANIAN, 2019; SOLTANI *et al.*, 2019). Além disso, desempenham atividade antimicrobiana e imunomoduladora (URDACI; BRESSOLLIER; PINCHUK, 2004).

3.6.2 *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans possui a capacidade de produzir catalase positiva e sobrevive a condições extremas de calor, acidez do estômago e sais biliares e inibem ainda, enteropatógenos (AMOAHA *et al.*, 2019). Atuam melhorando a saúde intestinal e apresentam antagonismo à patógenos (KHATRI *et al.*, 2016).

Ao contrário da maioria dos *Bacillus*, entre eles o *Bacillus subtilis*, que possuem endósporos presentes na porção sub-terminal ou central, a localização do seu endósporo é terminal e estes microrganismos têm a capacidade de produzir coagulina, que é uma proteína que impede a disseminação de invasores e a lactosporina que apresenta atividade antimicrobiana contra patógenos (KHATRI *et al.*, 2016).

Devido a capacidade de produzir enzimas envolvidas na excreção e digestão, *B. coagulans* pode auxiliar na digestão intestinal. Estes microrganismos também atuam na regulação da microbiota intestinal, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (AMOAHA *et al.*, 2019). Além disso, agem de forma positiva no sistema imune dos

animais, uma vez que possuem capacidade de normalizar os parâmetros quantitativos e atividade funcional das células envolvidas no sistema imunológico (KHATRI *et al.*, 2016).

3.6.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis tem sido largamente estudado atualmente, tanto em níveis genéticos quanto fisiológicos, possuem a capacidade de produzir bacteriocinas, subtilina e subtilosina (LEE; KIM, 2011). Também estão envolvidos na produção de diversas enzimas, tais como: desoxirribonuclease, ribonucleases, 3-nucleotidasas, aminopeptidase, esterase, proteases metálicas, α -Amilase, β -Amilase, arabinase, celulase e quitinase (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017).

Podem ser encontradas no solo e no trato gastrointestinal de diversos animais. Seus efeitos na administração em dietas para peixes são positivos, e vão desde imunestimulação, resistência a doenças a aumento no desempenho zootécnico (LEE *et al.*, 2018).

3.7 Sistema Imune de Peixes

O sistema imune inato é o mecanismo de defesa mais importante dos peixes, sendo este fundamental para a manutenção da homeostase (RODRIGUES *et al.*, 2020). O desencadeamento das respostas inflamatórias a um agente estressor, como por exemplo, proteína de ligação a GTP induzida por interferon-Mx1 (Mx), interleucina 1 β (IL-1 β) e amiloide-A sérico (SAA) estão diretamente relacionadas às respostas imunes inatas em peixes (EISSA *et al.*, 2018).

Sabe-se que o estresse é um dos fatores principais no surgimento de doenças e aumento da mortalidade em aquicultura (RODRIGUES *et al.*, 2020). Quando em condições de estresse, os peixes podem ter seus parâmetros bioquímicos afetados de forma aguda ou crônica e conseqüente supressão de suas respostas imunes inatas e adaptativas (AKANMU, 2018). Com isso, mecanismos de defesa inespecíficos que atuam de maneira significativa em todas as fases da infecção são desencadeados. Particularmente, os peixes dependem dos mecanismos de defesa inespecíficos de forma mais expressiva do que os mamíferos (RODRIGUES *et al.*, 2020). Diante disso,

tem-se o interesse em estimular o sistema imunológico desses animais para o tratamento e profilaxia contra doenças, visando a biologia e a sustentabilidade (EISSA *et al.*, 2018).

Os probióticos são importantes aliados no aumento da tolerância destes animais ao estresse (AKANMU, 2018). Portanto, quando administrados, atuam como agentes preparatórios capazes de neutralizar os aspectos estressores ambientais e de manejo, influenciando diretamente nos níveis de cortisol plasmático dos peixes (EISSA *et al.*, 2018).

A resposta ao estresse em peixes ocorre a nível celular, abrangendo proteínas de choque térmico (HSP), que estão fundamentalmente relacionadas à manutenção da homeostasia. Essas proteínas de choque térmico (HSP) têm impacto direto sobre a saúde e sobrevivência de peixes em situações de estresse. Sabe-se ainda, que situações de estresse impactam negativamente no crescimento dos peixes, bem como no fator de crescimento (Igf) através da expressão de insulina (EISSA *et al.*, 2018). Além disso, a fisiologia dos peixes também pode ser afetada, uma vez que em condições estressantes ocorre produção de moléculas instáveis reativas a oxigênio (ROS) de forma expressiva acarretando em demanda de energia e conseqüentemente desequilíbrio dos mecanismos de defesas a antioxidantes (FERREIRA; BARCELLOS, 2008). Nos peixes as enzimas antioxidantes desempenham papel de contrabalancear danos celulares e inativação enzimática, por meio da dismutação e catalisação de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (EISSA *et al.*, 2018).

3.8 Hematologia dos Peixes e Probióticos

No que diz respeito à hematologia de peixes e uso de probióticos sabe-se que há uma correlação positiva entre estes (RODRIGUES *et al.*, 2020). A hematologia é uma ferramenta importante para avaliar o estado clínico dos animais (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Sendo assim, para caracterizar o estado de saúde dos peixes utiliza-se além do exame físico, a avaliação dos parâmetros sanguíneos, baseando-se nos valores de hemograma e bioquímica plasmática (AKANMU, 2018).

Os probióticos atuam de forma significativa na proliferação de linfócitos (B e T), bem como na produção de imunoglobulinas dos peixes. Os linfócitos estão

relacionados ao nível de imunidade, já os neutrófilos e monócitos indicam os níveis de proteção contra invasões bacterianas (AKANMU, 2018).

Elevados índices nas concentrações de plaquetas podem indicar maior resistência e capacidade de cura de hematomas ou feridas, que podem surgir devido a brigas territoriais ou fatores relacionados ao ambiente de cultivo, tais como densidade de estocagem. Proporcionalmente heterófilos/linfócitos elevados são indicadores de estresse, relacionados a lesões. Baixos níveis de hemoglobina corpuscular média (MCH) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (McHc), podem indicar a ocorrência de anemia nos animais (AKANMU, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Toda a pesquisa foi conduzida seguindo os preceitos estabelecidos pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com protocolo de aprovação do Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA/UESC), número 007/20.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (AQUANUT), da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em Ilhéus, Bahia, Brasil (14° 47' 20" S 39° 02' 58" W), no período de abril a maio de 2021, com duração de 35 dias. Foram utilizados 244 juvenis da espécie matrinxã (*Brycon amazonicus*), peso médio inicial de $5,33 \pm 0,32$ g e comprimento padrão de $7,29 \pm 0,17$ cm, oriundos da Peixecon alevinos- Fazenda Vargem Alegre, Porciúncula - Rio de Janeiro.

4.1 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e quatro repetições, totalizando 16 unidades experimentais, e compreenderam os seguintes tratamentos: TC- Controle (ração sem adição de probiótico); TBS- *Bacillus subtilis* 1×10^{13} UFC por kg^{-1} de ração; TBC- *Bacillus coagulans* 1×10^{13} UFC por kg^{-1} de ração; TBCL- *Bacillus clausii* 1×10^{13} UFC por kg^{-1} de ração. O experimento foi conduzido em duas etapas: desempenho produtivo e desafio de estresse por captura.

4.2 Produção das Rações Experimentais e dos Microrganismos

4.2.1 Preparação dos Microrganismos Probióticos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus clausii*

No Laboratório de Patologia Aplicada e Genética-LAPAGEN, da Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, foram preparados os meios de cultura para os microrganismos utilizados no estudo (*B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. clausii*). Foi

preparado 1000 mL de meio de cultura em caldo para indução de esporulação contendo: DSM, nutrient Broth; cloreto de potássio (KCl); sulfato de magnésio (MgSO_4); água bidestilada, para cultivo dos probióticos. Posteriormente o meio foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos e após o seu resfriamento adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl_2) (1M) e sulfato de ferro (FeSO_4) (1M). Realizou-se então o pré-inóculo com cada microrganismo probiótico (*B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. clausii*) separadamente, no qual os mesmos foram mantidos em shaker sob agitação constante por um período de 24 horas. Após, realizou-se a distribuição dos meios em erlenmeyers de 100 mL, dos quais foram mantidos em shaker, sob agitação de 150 rpm, 37°C por três dias, para crescimento das colônias de bactérias. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10000 rpm, 4°C , durante dez minutos, o sobrenadante descartado e os endósporos armazenados no congelador para posterior quantificação.

Para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), adicionou-se 100 μL da cultura de endósporos em 900 μL de PBS 1%, procedendo-se a partir desta, a diluição seriada em eppendorfs até 10^{15} UFC. Após a diluição, realizou-se o plaqueamento adicionando-se 10 μL de cada diluição, segundo a técnica "*Spreader Plate*" em meio de cultura Ágar Padrão para Contagem, em duplicata. As placas permaneceram em estufa a 37°C por um período de 24 horas e após este período, realizou-se a contagem das UFC. Posteriormente, adicionou-se 13 mL de endósporos probióticos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus clausii*) nas rações peletizadas por meio de aspersão com auxílio de um pulverizador, e as mesmas foram encaminhadas à estufa de secagem a vapor por um período de 24 horas à 37°C .

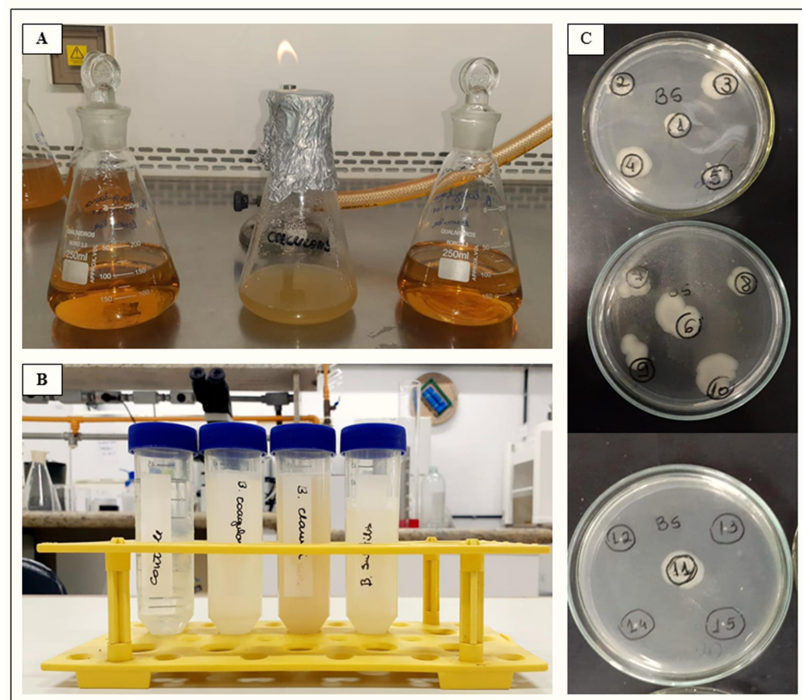


Figura 3. Meios de cultura de bactérias probióticas. A) Pré-inóculo de bactérias probióticas; B) Endósporo de bactérias probióticas após cultivo e centrifugação; C) Placa de petri com microrganismos probióticos evidenciando a contagem de unidade formadoras de colônias (UFC). **Fonte:** Autor.

4.2.2 Processamento da Ração

As rações experimentais formuladas com auxílio do programa SUPER CRAC[®] (tabela 01) e processadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (AQUANUT) na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Inicialmente os ingredientes foram pesados e homogêneos de acordo com a formulação calculada. Adicionou-se aproximadamente 300 mL de água (30°C), homogêneo-se novamente os ingredientes e posteriormente o material seguiu para o processo de peletização e secagem em estufa ventilada por um período de 24 horas à 50°C.

Após a secagem das rações, realizou-se por meio de aspersão manual a inoculação dos microrganismos probióticos na proporção aproximada de 13 mL de suspensão de endósporos líquido em 1000 g de ração em seus devidos tratamentos (figura 3). As rações foram novamente encaminhadas à estufa e permaneceram por um período de 24 horas à 37°C, para a retirada do excesso de umidade. Posteriormente foram retiradas, devidamente embaladas, identificadas e armazenadas à 4°C. Durante todo o período experimental realizou-se o acompanhamento dos parâmetros microbiológicos das rações (tabela 2).



Figura 4. Processamento da ração experimental. A) Peletização; B) Inoculação do probiótico por meio de aspersão. **Fonte:** Autor.

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional da dieta basal de matrinxã, *Brycon amazonicus*, para os diferentes probióticos utilizados

Alimento	Quantidade
Farelo de soja 45%	23,95
Fubá de milho	20,21
Farelo de trigo	14,18
Farelo de glúten e milho 22%	13,10
Farinha de peixe 55%	12,70
Farinha de carne e ossos 45%	6,23
Farinha de vísceras aves	6,60
Óleo de soja	1,68
Premix vitamínico-mineral	1,00
Sal comum	0,29
Total	100

Composição analisada

Nutriente	Quantidade
Proteína bruta (%)	31,30
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4424
Fibra bruta (%)	4,36
Gordura (%)	6,35
Lisina total (%)	1,93

Premix vitamínico mineral (composição/ kg do produto): vitamina A = 6.000.000 UI; vitamina D3 = 2.250.000 UI; vitamina E = 75.000 mg; vitamina K3 = 3.000 mg; vitamina tiamina = 5.000 mg; riboflavina = 10.000 mg; vitamina pirodoxina = 8.000 mg; biotina = 2.000 mg; vitamina C = 192.500 mg; niacina = 30.000 mg; ácido fólico = 3.000 mg; Fe = 100.000 mg; Cu = 600 mg; Mn = 60.000 mg; Zn = 150.000 mg; I = 4.500 mg; Cu = 15.000 mg; Co = 2.000 mg; Se = 400 mg.

Análise Qualitativa e Quantitativa da Ração

Para verificar a concentração do probiótico na ração, e averiguar se o inóculo probiótico se manteve viável e nas concentrações desejadas, realizou-se a cada sete dias durante todo período experimental, no Laboratório de Monitoramento Ambiental, da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC). Foram moídas e homogeneizadas amostras de 0,1 g de ração de cada tratamento, adicionou-se 900 μL PBS 1% e realizou-se a diluição de 100 μL da amostra em série até 10^{15} . Posteriormente 10 μL de cada diluição foi distribuída por "*Spreader Plate*" em meio estéril contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani Agar), em duplicata. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por um período de 24h. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas.

4.3 Desempenho Zootécnico

Após a recepção dos juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) os mesmos foram mantidos em quarentena (15 dias), alimentados com ração extrusada comercial balanceada (proteína bruta- 40%, tamanho do pélete 1,8 a 2,3mm) e aclimatados às condições laboratoriais. Após o período de aclimação, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 16 tanques, sendo 14 peixes/tanque, em um sistema de recirculação de água fechado, munido de aeração individualizada por meio de sopradores e pedras porosas, com sistema de filtragem através de filtro biológico.

Durante o período experimental os juvenis de matrinxã foram alimentados quatro vezes ao dia (8h00min, 11h00min, 13h00min e 15h00min) até a saciedade aparente.

Quanto à qualidade da água, durante todo o período experimental foram realizados manejo de limpeza dos tanques, sifonagem e renovação de água, duas vezes por semana, com a finalidade de evitar o acúmulo de sobras de ração e consequente eutrofização do meio. Além disso, os parâmetros físicos e químicos da água como temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH e oxigênio dissolvido (mgL^{-1}) foram mensurados diariamente por meio da sonda YSI Multiparâmetro digital Professional Plus (YSI *Incorporated*, *Yellow Springs*, OH, EUA). As análises de amônia (mgL^{-1}), nitrito (mgL^{-1}), nitrato (mgL^{-1}) e fosfato (mgL^{-1}) foram mensuradas semanalmente, utilizando o equipamento

HI 83203 Multiparâmetro fotômetro para aquicultura. Os parâmetros de qualidade de água se mantiveram constantes e dentro dos padrões adequados de cultivo estabelecidos para a espécie estudada (KUBITZA, 1999), apresentando os seguintes registros: temperatura= 28,6°C; amônia= 0,63mgL⁻¹; pH= 6,8; oxigênio dissolvido= 6,8mgL⁻¹; nitrito= 0,11mgL⁻¹; nitrato= 2,16mgL⁻¹ e fosfato=2,5mgL⁻¹.

Foram realizadas duas biometrias durante o período experimental (Biometria inicial e final), com auxílio de balança analítica e paquímetro digital. Para avaliação dos parâmetros zootécnicos utilizaram-se as seguintes equações:

$$\text{Ganho de peso (g)} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

$$\text{Conversão alimentar} = \frac{\text{Consumo de ração}}{\text{Ganho de peso}}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (TCE, \%)} = \left(\frac{\ln P_f - \ln P_i}{\text{tempo}} \right) \times 100$$

4.4 Desafio de Estresse por Captura

Ao final do experimento e antes do desafio de estresse realizou-se coleta de sangue de quatro peixes por tratamento. Posteriormente, estes animais foram eutanasiados seguindo os princípios éticos estabelecidos, no qual os mesmos foram imersos em banhos anestésicos (benzocaína 25 mgL⁻¹), e realizou-se a retirada e processamento das vísceras para realização da Histomorfometria intestinal e parâmetros microbiológicos do intestino.

Para avaliar o estresse pelo desafio de captura nos animais, retirou-se quatro animais por tratamento com auxílio de um puçá no qual os peixes foram mantidos fora d'água por 30 segundos, repetindo-se esse procedimento por quatro vezes a cada 60 minutos. Após o desafio, aguardou-se 60 minutos para realizar as amostragens sanguíneas e o material coletado seguiu para análises hematológicas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, para proceder-se a análise dos parâmetros hematológicos dos juvenis de matrinxã.



Figura 5. Juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetidos à desafio de estresse por captura. **Fonte:** Autor.

4.5 Parâmetros Hematológicos

Para determinar parâmetros hematológicos foram utilizados dois exemplares por repetição de cada tratamento, dos quais coletaram-se amostras de 1,5 mL de sangue por meio de punção vaso caudal ou cárdica, com auxílio de seringas descartáveis contendo EDTA (10%) (figura 06) (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003). O material foi processado no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC.



Figura 6. Coleta de sangue por meio de punção vaso caudal de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Fonte:** Autor.

Para determinar a concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) foi realizada a homogeneização dos tubos contendo o sangue com o anticoagulante EDTA, posteriormente, foi preenchido 2/3 do tubo capilar sem heparina e fechado a extremidade seca, protegendo o sangue da ação do calor. Após, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por cinco minutos na centrífuga de microhematócrito (Micro Spin). Retirou-se os capilares da centrífuga e quebrou-se acima da capa de leucócitos e o plasma foi encaminhado para o refratômetro para a leitura da concentração de PPT.

Para realização da Bioquímica sérica o soro foi extraído das amostras sem a presença de anticoagulante para a determinação das concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol total e fração de HDL. Utilizou-se tiras-teste reativas Reflotron® com leitura em analisador bioquímico Reflotron Plus®.

Para análise de cortisol o sangue foi acondicionado em eppendorfs e centrifugados à 1000 rpm por cinco minutos e 3000 rpm por mais cinco minutos, para coleta do plasma no qual foi congelado à -80°C para posterior análise de cortisol, determinado com kit comercial de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay kit - cortisol test – MonobindInc®). Para validação dos kits para cortisol plasmático dos juvenis de matrinxã realizaram-se testes intra e interespecíficos.

4.6 Histomorfometria Intestinal

Ao final do experimento um grupo de quatro animais por tratamento foi eutanasiado seguindo-se os princípios éticos estabelecidos, no qual os mesmos foram imersos em banhos anestésicos (benzocaína 25 mgL⁻¹). Por meio de incisão ventral realizou-se a remoção dos aparelhos digestórios e coletou-se partes do intestino anterior e médio dos peixes, do qual foi retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm (figura 6).



Figura 7. Juvenil de matrinxã, *Brycon amazonicus*, evidenciando a remoção do aparelho digestório. **Fonte:** Autor.

No Laboratório de Patologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), procedeu-se o processamento histológico dos intestinos. Realizou-se uma secção em sentido longitudinal, prendendo as extremidades a uma base de cartolina retangular, para exposição das vilosidades. Os fragmentos intestinais foram colocados individualmente em frascos contendo solução de *Bouin* (10%) por 24 horas. Após, foram conservados em solução de álcool 70%, para que então fossem submetidos ao processamento histológico de rotina. Os intestinos foram seccionados em secções de 0,05 cm, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e embebidos em parafina, para ser seccionado na espessura de 3 μm e corados pela hematoxilina-eosina (HE) (DE ARAÚJO *et al.*, 2018; MELLO *et al.*, 2013).

No Laboratório de Histoembriologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), determinou-se por meio de microscópio eletrônico com auxílio do *software ImageView*, a altura total das vilosidades, que correspondem ao ápice dos vilos até o término da serosa.

4.7 Parâmetros Microbiológicos do Aparelho Digestório

Para avaliar os parâmetros microbiológicos do aparelho digestório, dois animais por tratamento foram eutanasiados seguindo os princípios éticos estabelecidos, no qual os mesmos foram imersos em banhos anestésicos (benzocaína 25 mgL^{-1}). Posteriormente, realizou-se incisão ventral e parte do intestino anterior foi removido

de maneira asséptica, pesado e macerado em tubos esterilizados, nos quais adicionou-se 900 µL de PBS 1%. Os tubos contendo o material foram homogeneizados e diluídos em série até 10⁵. Posteriormente 10 µL de cada diluição foi distribuída por "*Spreader Plate*" em meio estéril contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani Agar), em duplicata. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por um período de 24h. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias (UFC's) foram quantificadas no Laboratório de Monitoramento Ambiental, da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC.

4.8 Parâmetros Microbiológicos das Fezes

Para a avaliação dos parâmetros microbiológicos das fezes, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e três repetições. Realizou-se a transferência de cinco peixes por tratamento para aquários de digestibilidade no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (AQUANUT), na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), no qual os animais passaram por um período de adaptação de sete dias e alimentados com ração comercial extrusada e balanceada.

Os aquários de digestibilidade estavam montados em um sistema de recirculação de água fechado, biofiltros biológicos e pedras porosas acopladas a um soprador de 1 CV. No início e final do dia foram realizadas descargas, a fim de possibilitar renovação de água e eliminação de sobras de rações e consequente eutrofização do meio. Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados durante todo o período.

Após o período de adaptação, os animais foram alimentados por 15 dias com as rações experimentais e ao final realizou-se a coleta de fezes.

Ao final da última alimentação, realizou-se descarga de água de aproximadamente 30 segundos, para eliminação de sobras de ração, para que não houvesse contaminação das fezes por ração. Após a descarga e reposição de água dos aquários de digestibilidade, acoplou-se coletores nas mesmas para então proceder-se a coleta de fezes. Os coletores acoplados foram mantidos em isopor supridos de gelo, a fim de manter a qualidade do material coletado. As coletas de material fecal

procederam-se no período noturno, a cada três horas (19h00; 22h00; 01h00; 4h00; 7h00).

A cada coleta, realizou-se a eliminação do excesso de água dos coletores e o material foi centrifugado a 3000 rpm por dez minutos, o sobrenadante foi descartado e o material fecal armazenado em tubos de Falcon sob refrigeração, para posterior contagem microbiológica no Laboratório de Monitoramento Ambiental, da Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC. O material foi homogeneizado e 100 µL da amostra foi misturado em 900 µL de PBS 1%. Procedeu-se então diluições em série até 10^4 . Posteriormente 10 µL de cada diluição foi distribuída por "*Spreader Plate*" em meio estéril contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani Agar), em duplicata. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por um período de 24h. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas.

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade, posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Dunnett e teste T à 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada no *software* R (R CORE TEAM, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão expressos os valores de quantificação microbiológica das rações experimentais utilizadas no período de 1-35 dias. Ao analisar a tabela 02, verifica-se que os endósporos probióticos se mantiveram viáveis durante todo o período experimental.

Tabela 2.Quantificação microbiológica (UFC g⁻¹) realizada nas rações experimentais no período 1-35 dias

Tratamento	Intervalos de tempo para quantificação microbiológica				
	1 dia	07 dias	14 dias	21 dias	35 dias
TC	NA	NA	NA	NA	NA
TBS	1x10 ¹³	1x10 ¹³	1x10 ¹¹	1x10 ⁷	1x10 ⁶
TBC	1x10 ¹³	1x10 ¹¹	1x10 ⁷	1x10 ¹²	1x10 ¹¹
TBCL	1x10 ¹³	1x10 ¹³	1x10 ¹⁴	1x10 ⁷	1x10 ¹¹

Legenda: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*. NA= não analisado.

Torres & Mancilha (2020) avaliaram em seu trabalho a viabilidade de quatro cepas de *Lactobacillus*, na forma de um “pool”, constituído por *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. casei* ATCC 7469 incorporados em ração de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e verificaram a manutenção satisfatória da viabilidade e da população celular ao longo do período de 120 dias de armazenamento.

5.1 Desempenho Zootécnico

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p > 0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho zootécnico (tabela 3) dos juvenis de matrinxã. A ausência de efeitos dos probióticos sobre estes parâmetros demonstram que os endósporos probióticos nas quantidades utilizadas não acarretaram alterações na produção de enzimas digestivas que exercem efeitos positivos nos processos de digestibilidade dos alimentos a ponto de afetar o desempenho dos animais (MEIDONG *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram

encontrados por Castro *et al.* (2021) em pós-larvas de tilápia do Nilo, onde parâmetros de desempenho produtivo não foram afetados pela inclusão de *Bacillus* sp. na ração.

Tabela 3. Desempenho zootécnico (média \pm desvio padrão) de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, alimentados com diferentes probióticos durante 35 dias

Variável	Tratamentos					p-value
	TC	TBS	TBC	TBCL	CV	
GP (g)	24,75 \pm 8,94	24,95 \pm 7,90	31,52 \pm 6,58	28,40 \pm 4,86	26,42	0,5021
C (cm)	6,08 \pm 1,03	6,08 \pm 0,98	7,26 \pm 0,83	6,34 \pm 0,80	14,27	0,2710
TCE (%)	17,38 \pm 2,97	17,37 \pm 2,81	20,73 \pm 2,36	18,12 \pm 2,30	14,27	0,2710
CA	1,56 \pm 0,68	1,37 \pm 0,33	1,36 \pm 0,26	1,37 \pm 0,16	17,86	0,7832
CS	36,45 \pm 12,27	32,20 \pm 2,56	55,51 \pm 23,65	46,48 \pm 15,68	36,37	0,1979

Legenda: GP (g) = ganho de peso; C (cm) = crescimento; CA= conversão alimentar; TCE (%) = taxa de crescimento específico; CS= consumo; CV= coeficiente de variação. Erro médio 95% confiança. Tratamentos: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*.

As médias de ganho de peso diário (TC= 0,71g; TBS= 0,71g; TBC= 0,900g; TBCL= 0,81g) foram inferiores aos relatados por Dias *et al.* (2012), que avaliaram o probiótico *Bacillus subtilis* em diferentes quantidades (0g, 5g e 10g) na alimentação de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) por 84 dias em tanque rede.

Meidong *et al.* (2018) avaliaram os efeitos do probiótico *Bacillus* spp. isolado de bagre híbrido saudável no crescimento, resistência a doenças e imunidade inata de Pla-mong, *Pangasius bocourti* e não observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no ganho de peso, taxa de crescimento específico (SGR) e taxa de conversão alimentar (FCR) entre os grupos de tratamento e controle durante os primeiros 30 dias dos experimentos de alimentação.

Araújo-Dairiki, Chaves & Dairiki (2018) não observaram diferenças significativas nos parâmetros de desempenho de crescimento em seu estudo utilizando probiótico (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* var. *toyoi*) e prebiótico (mananoligossacarídeos Biorigin®) na alimentação de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, na fase de reversão sexual.

Porém, no que diz respeito à conversão alimentar, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, valores inferiores foram registrados nos tratamentos que receberam a suplementação probiótica, sendo *Bacillus coagulans* o que se destacou (1,36 \pm 0,26). Liu *et al.* (2017) observaram valores de conversão alimentar

significativamente menores em tilápias alimentadas com ração contendo *B. subtilis* HAINUP40.

Dias *et al.* (2011) utilizaram o probiótico *Bacillus subtilis* 10^9 UFC na alimentação de larvas de matrinxã, *Brycon amazonicus*, e concluíram que a suplementação não favoreceu o desempenho zootécnico.

A ausência de efeitos probióticos sobre os parâmetros zootécnicos dos juvenis de matrinxã podem estar relacionadas ao período de administração (35 dias) na alimentação. Estudos relatam que os efeitos positivos a partir da suplementação probiótica na alimentação de peixes podem ser influenciados pela dosagem, frequência e período que estes microrganismos são oferecidos (DAWOOD *et al.*, 2019b; MEIDONG *et al.*, 2018).

5.2 Desafio de Estresse por Captura

5.2.1 Parâmetros Hematológicos

Em aquicultura é comum a prática de captura, seja em casos de transferência de peixes em viveiros, transporte para outras instalações, biometrias ou manejo em geral. Este procedimento é responsável por desencadear situações de estresse intenso, podendo ter efeito agudo e severo (HOSHIBA; GONÇALVES; URBINATI, 2009).

Neste estudo não foram verificadas diferenças significativas para os parâmetros bioquímicos (glicose, triglicérides, colesterol total e colesterol HDL) do sangue de juvenis de matrinxã, alimentados com diferentes probióticos e submetidos ao desafio de estresse por captura pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p > 0,05$). O que demonstra não terem sido afetados pelo desafio, uma vez que apresentam valores semelhantes ao controle (tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos do sangue de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, alimentados com rações contendo diferentes probióticos (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii*) e submetidos ao desafio de estresse por captura

Parâmetro (mgdL ⁻¹)	Tratamentos			
	TC	TBS	TBC	TBCL
Glicose	59,52±10,30	65,13±17,78	55,38±4,23	63,4±14,31
Triglicérides	22 5,5±71,06	141,2±46,37	276,5±76,43	211±101,55
Colesterol Total	106±8,98	101,5±3,00	117±25,02	114,5±21,19
Colesterol HDL	26,1±8,87	25,65±7,64	24,27±9,60	28,52±9,67

Legenda: Tratamentos: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*.

Ao analisar os valores obtidos para glicose, os mesmos estão dentro dos padrões estabelecidos para a espécie matrinxã (38,0-215,7mgdL⁻¹) e se mantiveram normais segundo Tavares-Dias; Mariano (2015). Marengoni *et al.* (2019) estudando a suplementação probiótica de *B. subtilis* e *B. cereus var. toyoi* para tilápias verificaram resultados semelhantes para os níveis de glicose nos quais não observaram alterações significativas entre os tratamentos com probióticos e o controle.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros de hematócrito e proteína plasmática total (PPT) pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p>0,05$) (tabela 5). Estes resultados demonstram que não houve aumento na demanda de energia pelos juvenis de matrinxã suplementados com diferentes probióticos e submetidos ao desafio de estresse por captura, conseqüentemente, a homeostase não foi comprometida, bem como o desenvolvimento dos animais.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, alimentados com rações contendo diferentes probióticos (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii*) e submetidos ao desafio de estresse de captura

Tratamento	Parâmetros	
	Antes do desafio	Após desafio
	HT	
TC	32,7±3,59 ^{ns}	28,5±2,64 ^{ns}
TBS	29,2±5,56 ^{ns}	30,5±5,07 ^{ns}
TBC	32,5±2,64 ^{ns}	33,0±2,00 ^{ns}
TBCL	31,0±3,37 ^{ns}	30,3±1,53 ^{ns}
	PPT	
TC	5,50±0,41 ^{ns}	5,7±0,30 ^{ns}
TBS	5,65±0,66 ^{ns}	5,5±0,53 ^{ns}
TBC	6,15±1,11 ^{ns}	5,3±0,42 ^{ns}
TBCL	6,25±1,17 ^{ns}	5,5±0,50 ^{ns}
	Cortisol	
TC	16,5±0,28 ^A	24,0±0,22 ^B
TBS	15,8±0,43 ^A	28,9±0,22 ^{B*}
TBC	18,9±0,45 ^A	33,3±0,51 ^{B*}
TBCL	21,4±0,29 ^A	22,5±0,14 ^{B*}

Legenda: HT= hematócrito; PPT=Proteína plasmática total. Tratamentos: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*. *Médias diferem significativamente do controle na mesma coluna pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p>0,05$), ^{ns}= não significativo. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste T pareado a 5% de significância ($p>0,05$).

O valor do hematócrito pode ser usado como macro análise do estado imunológico dos peixes devido ao aumento do número de células imunes no sangue durante a ativação imunológica. As células imunes que se encontram no sangue incluem neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos (SERIANI *et al.*, 2013; VALLEJOS-VIDAL *et al.*, 2016).

No que diz respeito aos níveis de hematócrito quantificados neste estudo os mesmos são considerados normais quando comparados aos valores de referência (25,0-52,0%) estabelecidos por Tavares-Dias e Mariano (2015) para a espécie matrinxã.

Respostas hematológicas são usualmente consideradas indicadores de estresse em peixes. Alterações no número de hematócritos, eritrócitos e concentração de hemoglobina podem indicar hemoconcentração ou hemodiluição inerentes à distúrbios

osmorregulatórios (HOSHIBA; GONÇALVES; URBINATI, 2009). Entretanto, o desafio de estresse por captura não interferiu nos valores de hematócrito (tabela 5), corroborando com os indicadores de glicose deste estudo para a espécie matrinxã.

Observou-se diferença significativa pelo teste T pareado ($p > 0,05$) para os níveis de cortisol no sangue de juvenis de matrinxã quando comparados antes e após o desafio de estresse por captura. Foram observados níveis de cortisol elevados em todos os tratamentos após o desafio. Isso demonstra que a suplementação probiótica não apresentou efeitos sobre as respostas ao estresse dos peixes.

Os peixes quando expostos a situações de estresse, são induzidos a produzir respostas que serão capazes de os capacitarem para lidar com alterações em seu ambiente. As respostas ao estresse contemplam um amplo estado de mudanças, sejam elas moleculares, fisiológicas ou comportamentais, que objetivam neutralizar os efeitos estressores e consequente recuperação do equilíbrio homeostático (HOSHIBA; GONÇALVES; URBINATI, 2009). Dentre os vários processos, está a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI), que resulta na estimulação da via esteroidogênica, consequentemente liberando cortisol, que é um importante mediador da resposta adaptativa ao estresse. O aumento de glicose e cortisol são considerados indicadores relevantes da ocorrência de estresse em vários organismos (HOSHIBA; GONÇALVES; URBINATI, 2009; TELES *et al.*, 2017).

Houve diferença estatística significativa pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p > 0,05$) entre os tratamentos com probióticos e controle para cortisol. O tratamento com probiótico *Bacillus clausii* foi o que se destacou e registrou o menor valor para cortisol após o desafio. Este fato demonstra que esse microrganismo apresentou efeitos positivos sobre o cortisol de juvenis de matrinxã submetidos ao desafio de estresse por captura, devido à sua manutenção em níveis inferiores ao tratamento controle. Vale salientar que são escassos estudos com a utilização de *B. clausii* na suplementação probiótica de peixes.

Quando os peixes são submetidos à captura, seja ela por motivos de transporte ou manejo, entre outros, eles tendem a fugir, e posteriormente são expostos ao ar, fazendo com que hajam respostas fisiológicas, tais como elevação da concentração de lactato e íons H no tecido muscular, estas alterações podem ser identificadas na

corrente sanguínea, além de aumento nas concentrações de cortisol e glicose. Estes últimos (cortisol e glicose) são indicadores de estresse, sendo a glicose constituinte de uma fonte extra de energia, que auxilia o animal a superar distúrbios ocasionados pelo agente estressor, o cortisol é responsável pelo controle do balanço hidromineral e pelo controle do metabolismo energético. O cortisol pode ainda influir sobre a redução nas taxas de crescimento, suprimindo respostas imunes e reprodutivas (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015).

Portanto, é de suma importância que os peixes estejam imunologicamente preparados, uma vez que, com isso seja possível recuperar rapidamente suas condições fisiológicas normais. Os probióticos são importantes aliados na mitigação de agentes estressores em aquicultura, fazendo-se necessário sua utilização com antecedência e de forma continuada (EISSA *et al.*, 2018).

5.3 Histomorfometria Intestinal

Foram observadas diferenças significativas pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p > 0,05$) entre o tamanho das microvilosidades intestinais dos animais alimentados com ração suplementada de probiótico (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii*) quando comparados ao tratamento controle (sem adição de probiótico) (tabela 6).

Tabela 6. Comprimento de microvilosidades intestinais (média \pm desvio padrão) de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) alimentados com dietas suplementadas com *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus clausii* por 35 dias

Tratamento	Comprimento de vilosidade (μm)
TC	82,17 \pm 7,18
TBS	123,82 \pm 11,14*
TBC	118,05 \pm 18,65*
TBCL	107,04 \pm 5,72*

Legenda: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*. *Médias diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p > 0,05$).

O aumento no comprimento das microvilosidades intestinais médias nos tratamentos utilizando a suplementação probiótica indicam aumento da área de

superfície de absorção intestinal. Os resultados de microbiologia do aparelho digestório corroboram com esta afirmativa.

Xia *et al.* (2020) avaliaram os efeitos da suplementação probiótica (*B. subtilis* 1×10^8 UFC/g, *B. cereus* 1×10^8 UFC/g, *B. subtilis* + *B. cereus* 0.5×10^8 UFC/g) na dieta sobre o crescimento, saúde intestinal e resistência a doenças de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e observou que os animais alimentados com ração suplementada de probiótico apresentaram microvilosidades intestinais mais longas e densas que o grupo controle. Estes autores também relacionam o aumento das microvilosidades intestinais com aumento da área de superfície absorptiva intestinal com a aplicação de probióticos, indicando que o aumento do comprimento e da densidade das microvilosidades intestinais podem contribuir para o aumento de resistência a doenças, digestibilidade de alimentos e desempenho de crescimento de peixes.

5.4 Parâmetros Microbiológicos do Aparelho Digestório

Os microrganismos presentes no trato intestinal desempenham um papel relevante na formação da estrutura do mesmo. Esses microrganismos auxiliam nas funções digestivas e absorção de nutrientes, consequentemente melhoram o sistema imunológico, através de barreiras que atuam como mecanismos de defesa contra organismos patogênicos melhorando a saúde e sobrevivência dos seus hospedeiros (AMOAHA *et al.*, 2019; ASADUZZAMAN *et al.*, 2018).

Uma propriedade a ser considerada ao utilizar probióticos na alimentação animal é a sua capacidade de resistir às atividades de enzimas digestivas e exercer seus efeitos locais (LIU *et al.*, 2017).

Não foram observadas diferenças estatísticas pelo teste de Dunnett a 5% de significância ($p > 0,05$) entre o tratamento controle e os tratamentos com suplementação probiótica. Entretanto, ao analisar a quantificação microbiológica do intestino dos juvenis de matrinxã observa-se que os microrganismos utilizados apresentaram concentrações satisfatórias (tabela 7). Os resultados mostram que os microrganismos administrados na dieta na forma de endósporos podem ter encontrado um meio

favorável, se multiplicando em células vegetativas e com isso podem ter influenciado na microbiota e estrutura intestinal da espécie estudada.

Tabela 7. Concentração probiótica (UFC g⁻¹) do intestino de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*, suplementados com diferentes probióticos (*B. subtilis*, *B. Coagulans*, *B. clausii*) durante 35 dias

Tratamento	UFC g ⁻¹
TC	5x10 ¹²
TBS	2,5 x 10 ¹²
TBC	2,55 x 10 ¹⁴
TBCL	5 x 10 ¹²

Legenda: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*.

Xia *et al.* (2020) utilizaram a tecnologia de sequenciamento profundo 16S rDNA de alto rendimento para analisar a microbiota intestinal de tilápias alimentadas com ração suplementada de probiótico. Os autores verificaram que a cobertura do sequenciamento foi suficiente para todos os tratamentos, indicando a representatividade da amostra nas unidades taxonômicas operacionais (OTU).

5.5 Parâmetros Microbiológicos das Fezes

Não foram observadas diferenças estatísticas pelo teste T a 5% de significância (p>0,05) entre a concentração microbiológica do intestino e das fezes. A ausência de diferença na contagem microbiológica do intestino e fezes pode ser decorrente do excesso de bactéria na dieta, que é liberada por não conseguir colonizar o intestino ou pela modulação da microbiota intestinal no decorrer do bolo fecal pelo trato digestório (PAIXÃO *et al.*, 2018). Entretanto, de acordo com os resultados de contagem microbiológica observa-se que os valores quantificados no intestino foram satisfatórios (tabela 8).

Tabela 8. Concentração probiótica média (UFC g⁻¹) do intestino e fezes de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) suplementados com diferentes microrganismos probióticos

Tratamentos	Contagem microbiológica (UFC g ⁻¹)	
	Intestino	Fezes
TC	5x10 ¹²	5,1 x 10 ⁶

TBS	$2,5 \times 10^{12}$	$4,9 \times 10^6$
TBC	$2,55 \times 10^{14}$	$1,71 \times 10^6$
TBCL	5×10^{12}	$3,04 \times 10^6$

Legenda: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*.

Com relação a análise microbiológica das fezes dos juvenis de matrinxã verificou-se que 12 horas após a última alimentação, o tratamento utilizando a suplementação probiótica de *B. coagulans* apresentou aumento na concentração probiótica e o tratamento com *B. clausii* teve redução na concentração probiótica nas fezes. Já o tratamento com *B. subtilis* diminuiu a concentração de microrganismos probióticos 12 horas após a última alimentação e voltou a subir 14 horas após. Com relação ao tratamento controle, mesmo apresentou comportamento semelhante ao tratamento com *B. subtilis* (figura 8).

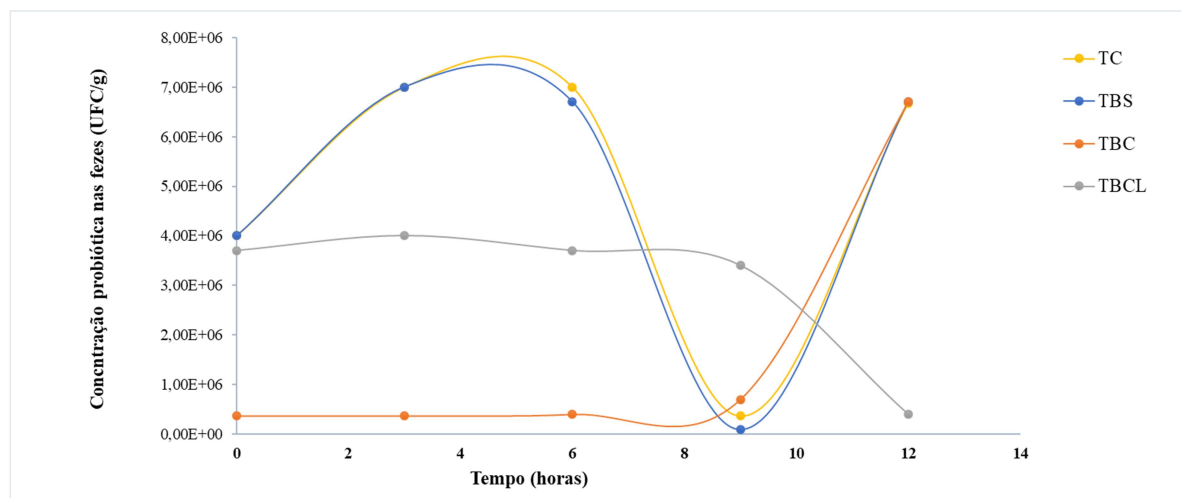


Figura 8. Variação da eliminação (12 horas) de probiótico pelas fezes de matrinxã, *Brycon amazonicus*, suplementados com probióticos durante 35 dias. Legenda: TC=Controle; TBS= *B. subtilis*; TBC= *B. coagulans*; TBCL= *B. clausii*.

6 CONCLUSÃO

A incorporação de 10^{13} UFC de endósporos das linhagens probióticas de *B. subtilis*, *B. coagulans* e *B. clausii* se mantiveram viáveis durante o período experimental, contudo, não promoveram a melhoria dos parâmetros de desempenho e

da resposta ao estresse nos juvenis de matrinxã submetidos ao desafio de estresse por captura dentro do período de avaliação. Porém, foi observado que os endósporos promoveram aumento das vilosidades intestinais da porção anterior e estes se mantiveram viáveis no intestino e nas fezes dos juvenis de matrinxã.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARIKE, E. D.; CAI, J.; LU, Y.; YU, H.; CHEN, L.; JIAN, J.; TANG, J.; JUN, L.; KUEBUTORNYE, F. K. A. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 82, n. June, p. 229–238, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.037>
- AKANMU, O. A. Probiotics, an Alternative Measure to Chemotherapy in Fish Production. In: **Probiotics - Current Knowledge and Future Prospects**. [S. l.]: InTech, 2018. v. 9p. 13. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.72923>
- ALEMAYEHU, T. A.; GEREMEW, A.; GETAHUN, A. The Role of Functional Feed Additives in Tilapia Nutrition. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 09, n. 02, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000249>
- ALVES, K. C. S.; EDILENE, M.; ALMEIDA, M. De; CORREA, J.; ARAÚJO, F.; PEREIRA, K. D.; CASTRO, D. P. De; ANDRÉ, L.; MARIÚBA, M. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 15–23, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>
- AMOAHA, K.; HUANG, Q.-C.; TAN, B.-P.; ZHANG, S.; CHI, S.-Y.; YANG, Q.-H.; LIU, H.-Y.; DONG, X.-H. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, n. December 2018, p. 796–808, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- ARAÚJO-DAIRIKI, T. B.; CHAVES, F. C. M.; DAIRIKI, J. K. Seeds of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae) as a feed ingredient for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characidae). **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 32–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/doi.org/10.1590/1809-4392201700753>
- ASADUZZAMAN, M.; IEHATA, S.; AKTER, S.; KADER, M. A.; GHOSH, S. K.; KHAN, M. N. A.; ABOL-MUNAFI, A. B. Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of *Malaysian Mahseer* *Tor tambroides*. **Aquaculture Reports**, v. 9, n. January, p. 53–61, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.12.003>
- BERNARDEAU, M.; LEHTINEN, M. J.; FORSSTEN, S. D.; NURMINEN, P. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of Food Science and Technology**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2688-3>
- BHARATI, S.; ANTONY, C.; RAJAGOPALASAMY, C.; UMA, A.; AHILAN, B.; AANAND, S. Functional feed additives used in fish feeds. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 7, n. 3, p. 44–52, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Bharathi->

-
- Subramaniam/publication/333428807_Functional_feed_additives_used_in_fish_feeds/links/5ced30f392851c1ad4984971/Functional-feed-additives-used-in-fish-feeds.pdf
- BRABO, M. F.; FERNANDO, L.; PEREIRA, S.; ABREU, D.; CAMPELO, V.; VERAS, G. C. Cenário atual da produção de pescado no mundo , no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. v. 4, p. 50–58, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2312/ActaFish.2016.4.2.50-58>
- BRITO, J. M. de; FERREIRA, A. H. C.; SANTANA JÚNIOR, H. A.; OLIVEIRA, A. P. A.; SANTOS, C. H. L.; OLIVEIRA, L. T. S. Desempenho zootécnico de juvenis de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com cepas probióticas e submetidos a desafio sanitário. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-37348>
- BRUFAU, J.; ESTEVE, E.; TARRADAS, J. Review of immune stimulator substances/agents that are susceptible of being used as feed additives: mode of action and identification of end-points for efficacy assessment. **EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT**, p. 1–267, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.en-905>
- CALIXTO, E. S.; SANTOS, D. F. B.; LANGE, D.; GALDIANO, M. S.; RAHMAN, I. U. Aquaculture in Brazil and worldwide: overview and perspectives. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 5, n. 1, p. 098–107, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.24221/jeap.5.1.2020.2753.098-107>
- CASTRO, V. S. de; XAVIER, D. T. O.; SILVA, A. F. C. da; FONSECA, J. R. S.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A.; SIGNOR, A. A. Probiotics of the gender *Bacillus* in diets for Nil tilapia post-larves (*Oreochromis niloticus*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e51810717032, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.17032>
- CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- DAWOOD, M. A. O.; ABO-AL-ELA, H. G.; HASAN, M. T. **Modulation of transcriptomic profile in aquatic animals: Probiotics, prebiotics and synbiotics scenarios.** [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2020. v. 97E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.054>
- DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ABDEL-DAIM, M. M.; VAN DOAN, H. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 907–924, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12272>
- DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ABDEL-DAIM, M. M.; VAN DOAN, H. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 907–924, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12272>
- DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M. Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 950–974, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- DE ARAÚJO, E. R. L.; BARBAS, L. A. L.; ISHIKAWA, C. M.; DE CARLA DIAS, D.; SUSSEL, F. R.; DE ALMEIDA MARQUES, H. L.; TACHIBANA, L. Prebiotic,

probiotic, and synbiotic in the diet of Nile tilapia post-larvae during the sex reversal phase. **Aquaculture International**, v. 26, n. 1, p. 85–97, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0201-7>

DEY, A.; GHOSH, K.; HAZRA, N. Effects of probiotics-encapsulated live feed on growth and survival of juvenile *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) after differential exposure to pathogenic bacteria. **SAARC Journal of Agriculture**, v. 16, n. 1, p. 105–113, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3329/sja.v16i1.37427>

DIAS, D. C.; LEONARDO, A. F. G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C. F.; BORDON, I. C. A. C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 1, p. 40–45, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01892.x>

DIAS, D. de C.; CORRÊA, C. F.; LEONARDO, A. F. G.; TACHIBANA, L.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 365–368, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i4.11764>

DUTTA, D.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, A.; GHOSH, K. Potential gut adherent probiotic bacteria isolated from Rohu, *Labeo rohita* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae): Characterisation, exo-enzyme production, pathogen inhibition, cell surface hydrophobicity, and bio-film formation. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 48, n. 3, p. 221–233, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3750/AIEP/02251>

EISSA, N.; WANG, H.-P.; YAO, H.; ABOU-ELGHEIT, E. Mixed *Bacillus* Species Enhance the Innate Immune Response and Stress Tolerance in Yellow Perch Subjected to Hypoxia and Air-Exposure Stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6891, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25269-z>

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. **World Health Organization**, Londres, 30 maio. 2002, p. 1–11. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

FARIAS, A. C. da S.; FARIAS, R. B. A. Desempenho comparativo entre países exportadores de pescado no comércio internacional: Brasil eficiente? **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 451–466, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560306>

FERREIRA, D.; BARCELLOS, L. J. G. Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 601–611, 2008. Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/34_4_601-611.pdf

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 66 (5): 3, p. 365–378, 1989. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2666378/>

GENG, X.; DONG, X.-H.; TAN, B.-P.; YANG, Q.-H.; CHI, S.-Y.; LIU, H.-Y.; LIU, X.-Q. Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 46–55, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00875.x>

GOBI, N.; VASEEHARAN, B.; CHEN, J. C.; REKHA, R.; VIJAYAKUMAR, S.; ANJUGAM, M.; ISWARYA, A. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 74, n. 2018, p. 501–508, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.066>

GOMES, V. D. S.; SILVA, J. H. V. da; CAVALCANTI, C. R.; FILHO, J. J.; ALMEIDA, J. L. dos S.; AMÂNCIO, A. L. de L.; LUCENA, C. É. A. de. Avanços do uso de enzimas na nutrição de tilápias. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/acd.v19i1.57380>

GONÇALVES, C. A. A.; PANTOJA-LIMA, J.; MACHADO-BUSSONS, M. R. F.; RUFINO, J. P. F. Apparent digestibility of juveniles of matrinxã *Brycon amazonicus* fed diets with different protein levels. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 43, n. 1, p. e52236, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.52236>

HAI, N. V. The use of probiotics in aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 917–935, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12886>

HOSHIBA, M. A.; GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Physiological stress responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after chasing. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 445–452, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0044-59672009000200025>

IANIRO, G.; RIZZATTI, G.; PLOMER, M.; LOPETUSO, L.; SCALDAFERRI, F.; FRANCESCHI, F.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, A. *Bacillus clausii* for the Treatment of Acute Diarrhea in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Nutrients**, v. 10, n. 8, p. 1074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10081074>

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal/S. l.: s. n./p. 3940**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>

INTERAMINENSE, J. A.; VOGLEY, J. L.; GOUVEIA, C. K.; PORTELA, R. W. S.; OLIVEIRA, J. P.; ANDRADE, H. A.; PEIXOTO, S. M.; SOARES, R. B.; BUARQUE, D. S.; BEZERRA, R. S. In vitro and in vivo potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella* algae for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. **Aquaculture**, v. 488, n. 17, p. 114–122, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.027>

JESUS, G. F. A.; PEREIRA, S. A.; PEREIRA, G. do V.; DA SILVA, B. C.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P. Probióticos na Piscicultura. *In*: PEREIRA, G.

- R.; PIRES, H. da S.; FERREIRA, L. S. B. P.; KANGERSKI, K. W. (org.). **Piscicultura continental com enfoque ecológico**. 1. ed. [S. l.]: Instituto Federal de Santa Catarina, 2016. p. 64–94. *E-book*. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/316089015_Probioticos_na_Piscicultura
- KHATRI, I.; SHARMA, G.; SUBRAMANIAN, S. Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 307, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1680-7>
- KHATRI, I.; SHARMA, S.; RAMYA, T. N. C.; SUBRAMANIAN, S. Complete Genomes of *Bacillus coagulans* S-lac and *Bacillus subtilis* TO-A JPC, Two Phylogenetically Distinct Probiotics. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156745, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156745>
- KUBITZA, F. **Qualidade de água na produção de peixes**. [S. l.: s. n.]. v. 3
- KUBITZA, F. Brazilian aquaculture : Constraints and challenges (Part 2). **The global aquaculture advocate**, n. Part 2, p. 1–5, 2016. Disponível em: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/brazilian-aquaculture-constraints-and-challenges-part-1/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZB>
- KUEBUTORNYE, F. K. A.; ABARIKE, E. D.; LU, Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 87, n. November 2018, p. 820–828, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- KUEBUTORNYE, F. K. A.; WANG, Z.; LU, Y.; ABARIKE, E. D.; SAKYI, M. E.; LI, Y.; XIE, C. X.; HLORDZI, V. Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 97, n. October 2019, p. 83–95, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.046>
- LEE, H.; KIM, H.-Y. Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 229–235, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/jmb.1010.10017>
- LEE, S.; KATYA, K.; HAMIDOGHLI, A.; HONG, J.; KIM, D.-J.; BAI, S. C. Synergistic effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* WB60 and mannanoligosaccharide (MOS) on growth performance, immunity and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 83, n. September, p. 283–291, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.031>
- LEITE, A. C. V. **Avaliação do desempenho zootécnico, hematologia e atividade enzimática de juvenis de matrinxã alimentados com níveis crescentes de proteína**. 2019. - Universidade Federal do Amazonas, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6736>
- LI, C.; REN, Y.; JIANG, S.; ZHOU, S.; ZHAO, J.; WANG, R.; LI, Y. Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus*

- japonicus* Selenka. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 74, n. 2018, p. 69–75, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.037>
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- LIU, H. *et al.* Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, n. 2017, p. 326–333, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>
- LIU, S.; WANG, S.; CAI, Y.; LI, E.; REN, Z.; WU, Y.; GUO, W.; SUN, Y.; ZHOU, Y. Beneficial effects of a host gut-derived probiotic, *Bacillus pumilus*, on the growth, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. **Aquaculture**, v. 514, p. 734446, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734446>
- MAPA. Instrução Normativa 13/2004 **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**, [S. l.: s. n.]p. 1–10. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>
- MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M.; BESEN, M. A.; WEISS, L. A. Perfil hematológico e bioquímico e prevalência parasitária em tilápia-do-Nilo arraçadas com probióticos dietários. **Revista Agrarian**, v. 12, n. 46, p. 503–513, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i46.9553>
- MEIDONG, R.; KHOTCHANALEKHA, K.; DOOLGINDACHBAPORN, S.; NAGASAWA, T.; NAKAO, M.; SAKAI, K.; TONGPIM, S. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 73, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.032>
- MELLO, H. De *et al.* Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 724–730, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/vLbWsJWzwgbdYRTZ9sD6cDb/?format=pdf&lang=pt>
- NANDI, A.; BANERJEE, G.; DAN, S. K.; GHOSH, K.; RAY, A. K. Probiotic efficiency of *Bacillus* sp. in *Labeo rohita* challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 8, p. 4334–4345, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.13255>
- NASCIMENTO, G. B.; AMARAL, L. do V.; RAMOS, N. C.; LITAIFF, N. R.; RIBEIRO, M. W. S.; LADISLAU, D. da S.; ARIDE, P. H. R.; OLIVEIRA, A. T. Parâmetros hematológicos do Matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae: Bryconinae) criados em cativeiro na região Amazônica. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 3303–3315, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-238>

-
- PAIXÃO, P. E. G. *et al.* Avaliação não invasiva indireta para determinação da colonização probiótica intestinal em peixes. *In: EMBRAPA. [S. l.: s. n.]. p. 27–31. E-book.* Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1099316/avaliacao-nao-invasiva-indireta-para-determinacao-da-colonizacao-probiotica-intestinal-em-peixes>
- PANDIYAN, P.; BALARAMAN, D.; THIRUNAVUKKARASU, R. Probiotics in aquaculture. **Drug Invention Today**, v. 5, n. 1, p. 55–59, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>
- PANIGRAHI, A.; VISWANATH, K.; SATOH, S. Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. **Aquaculture Research**, p. 906–917, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02633.x>
- PEIXE-BR. ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2020. **Associação Brasileira de Piscicultura**, v. 1, p. 1–136, 2020. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>
- PINHEIRO, R. E. E.; RODRIGUES, A. M. D.; LIMA, C. E.; SANTOS, J. T. O.; PEREYRA, C. M.; TORRES, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; LOPES, J. B.; MURATORI, M. C. S. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic agent and a possible aflatoxin B1 adsorbent in simulated fish intestinal tract conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 862–870, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11280>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing.** . Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org/>
- RAHMAN, M. Feed the future Bangladesh Aquaculture and Nutrition Activity. *In: USAID; FISH, W. (org.). Handbook on Environment Compliance.* 2.2 ed. Bangladesh: [s. n.], 2019. *E-book.* Disponível em: <https://digitalarchive.worldfishcenter.org/bitstream/handle/20.500.12348/4551/9539998327cd6b4ba3ccc833f1ec6a5d.pdf>
- RINGØ, E. Probiotics in shellfish aquaculture. **Aquaculture and Fisheries**, v. 5, n. 1, p. 1–27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001>
- RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; NASCENTE, E. de P.; PAULA, F. G.; PASCOAL, L. M. Sistema imune inato de peixes e o uso do alho como imunostimulante: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e152943014, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i4.3014>
- SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian’s aquaculture development. **Acta Fish. Aquat. Res**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/DOI10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9>
- SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. R. V. Evolução Da Piscicultura No Brasil: Diagnóstico e Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Tilápia. **Instituto de pesquisa Econômica Aplicada - Ipea**, p. 42, 2017. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8043/1/td_2328.pdf

- SERIANI, R.; ABESSA, D. M. de S.; PEREIRA, C. D. S.; KIRSCHBAUM, A. A.; ASSUNÇÃO, A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 2, p. 105–111, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-87592013000200003>
- SILVA, C. D. M.; PIRES, C. R. F.; SOUSA, D. N.; CHICRALA, P. C. M. S.; SANTOS, V. R. V. Avaliação sensorial de matrinxã (*Brycon amazonicus*) enlatada com cobertura de óleo vegetal. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 3, p. 161–169, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18067/jbfs.v3i3.96>
- SIQUEIRA, T. V. De. **Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável**. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2018. v. 25E-book. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/16085>
- SOLTANI, M.; GHOSH, K.; HOSEINIFAR, S. H.; KUMAR, V.; LYMBERY, A. J.; ROY, S.; RINGØ, E. Genus *bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 27, n. 3, p. 331–379, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- TAN, H. Y.; CHEN, S.-W.; HU, S.-Y. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 92, n. February, p. 265–275, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.027>
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. de. Características hematológicas da Tilapia *rendalli boulenger*, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 107–114, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. dos S. **Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas**. Pedro & Jo ed. São Carlos-SP: [s. n.], 2015. v. 1E-book. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140960/1/2015CL09.pdf>
- TELES, M.; SOARES, A. M. V. M.; TORT, L.; GUIMARÃES, L.; OLIVEIRA, M. Linking cortisol response with gene expression in fish exposed to gold nanoparticles. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 1004–1011, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.153>
- THURLOW, C. M.; WILLIAMS, M. A.; CARRIAS, A.; RAN, C.; NEWMAN, M.; TWEEDIE, J.; ALLISON, E.; JESCOVITCH, L. N.; WILSON, A. E.; TERHUNE, J. S.; LILES, M. R. *Bacillus velezensis* AP193 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication. **Aquaculture**, v. 503, n. November 2017, p. 347–356, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.051>
- TORRES, D. E.; MANCILHA, I. M. Avaliação da viabilidade de microrganismos probióticos incorporados em ração de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 6, p. 2381–2386, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1678-4162-11190>

URDACI, M. C.; BRESSOLLIER, P.; PINCHUK, I. *Bacillus clausii* Probiotic Strains. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, n. Supplement 2, p. S86–S90, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69>

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12164>

VALLEJOS-VIDAL, E.; REYES-LÓPEZ, F.; TELES, M.; MACKENZIE, S. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 34–69, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.028>

XIA, Y.; WANG, M.; GAO, F.; LU, M.; CHEN, G. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animal Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 69–79, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.07.002>