

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**β -Glucano na piscicultura: efeitos na
incubação dos ovos, sistema imune inato e
microbiota intestinal**

Raphael Barbeta de Jesus

**Jaboticabal, São Paulo
2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**β -Glucano na piscicultura: efeitos na
incubação dos ovos, sistema imune inato e
microbiota intestinal**

Raphael Barbetta de Jesus

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Coorientador: Dr. Geert Frits Wiegertjes

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Aquicultura do
Centro de Aquicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor.

**Jaboticabal, São Paulo
2019**

J58b Jesus, Raphael Barbeta de
β-Glucano na piscicultura : efeitos na incubação dos ovos,
sistema imune inato e microbiota intestinal / Raphael Barbeta de
Jesus. -- Jaboticabal, 2019
vi, 80 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2019
Orientadora: Fabiana Pilarski
Coorientador: Geert Frits Wiegertjes
Banca examinadora: Fábio Sabbadin Zanuzzo, Geovana Dotta
Tamashiro, Leonardo Susumu Takahashi, Marianna Vaz Rodrigues
Bibliografia

1. Imunoestimulantes. 2. Microbiota intestinal. 3. Ovos. 4. Pacu.
5. Prebióticos. 6. Tilápia do Nilo. 7. β-glucano. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: -Glucano na piscicultura: efeitos na incubação dos ovos, sistema imune inato e microbiota intestinal

AUTOR: RAPHAEL BARBETTA DE JESUS

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

COORDENADOR: GEERT WIEGERTJES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura - CAUNESP

Profa. Dra. MARIANNA VAZ RODRIGUES

Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. FÁBIO SABBADIN ZANUZZO

Department of Ocean Sciences and Biology / University of Newfoundland

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Pós-Doutoranda GEOVANA DOTTA TAMASHIRO
/ Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2019

Sumário

DEDICATÓRIA.....	iii
APOIO FINANCEIRO.....	v
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
MANUSCRITO I	8
1. Introdução.....	10
2. Material e métodos	10
3. Resultados.....	12
4. Discussão	13
5. Referências	15
MANUSCRITO II	18
1. Introdução.....	20
2. Material e métodos	21
3. Resultados.....	26
4. Discussão	29
5. Referências	35
MANUSCRITO III	44
1. Introdução.....	46
2. Material e métodos	48
3. Resultados.....	52
4. Discussão	58
5. Referências	64
DISCUSSÃO GERAL	74
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	75

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 11336/15 do trabalho de pesquisa intitulado **"Caracterização da resposta imune inata induzida por 1,3/1,6 Beta-Glucano em pacu"**, sob a responsabilidade da Dr^a Fabiana Pilarski, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

A handwritten signature in blue ink, reading "P. Moraes", is placed above the printed name of the coordinator.

Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

EPÍGRAFE

"Quem come o fruto da árvore do conhecimento é sempre expulso de algum paraíso." (William Ralph Inge)

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra ao meu pai Valdemar de Jesus Sobrinho (*in memoriam*) e a minha mãe Rosana Celeste Barbeta de Jesus.

AGRADECIMENTOS

Esta tese seja talvez o resultado mais visível do processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma, agradeço àqueles que dela fizeram parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo simples fato de existirem.

À minha querida amiga e orientadora Profa. Dra. Fabiana Pilarski, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, sou grato por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela pesquisa.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Geert F. Wiegertjes e ao amigo Dr. Jules Petit por me receberem de forma afetuosa em seu país e pelas inúmeras e valiosas trocas de conhecimento.

A todos os amigos que fizeram parte do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) e que durante todos estes anos souberam fazer do ambiente de trabalho um lugar acolhedor, construtivo e agradável de se conviver.

Aos queridos Prof. Dr. Roque Takahashi, Dr. Danísio P. Munari, Dra. Maria Imaculada Fonseca e Dra. Maria Inez E. G. Martins pela inspiração profissional e pessoal que são em minha vida.

Aos meus ex-orientadores Prof. Dr. Jackson A. M. de Souza, Dra. Telma T. Berchielli e Dra. Eliana G. de M. Lemos por todas as oportunidades e lições aprendidas.

Ao meu pai Valdemar de Jesus Sobrinho (*in memoriam*) pela grandeza do seu amor. Pai, sua morte precoce é marca viva. Sua memória é exemplo de dignidade e honestidade. Agradeço a você por ter sido meu pai.

À minha mãe Rosana C. Barbetta de Jesus pela sabedoria em me educar, pela sua espiritualidade, pelo amor e carinho de mãe que soube me proteger e me ensinar os limites da vida.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me presentearam com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu sincero e reconhecido agradecimento.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Auxílio Financeiro (Processo nº 13/50418-1). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO:

O β -glucano é uma molécula estudada como aditivo alimentar na piscicultura há vários anos, sendo descritos na literatura como imunoestimulante e atuando positivamente de diversas formas, como no crescimento, resistência aos patógenos, expressão dos genes do sistema imune inato, entre outros parâmetros. No presente estudo, diferentes abordagens de utilização com diferentes moléculas de β -glucanos foram avaliadas. No primeiro estudo, avaliamos os efeitos do banho de solução de β -glucano (100 mg L^{-1}) durante 8 dias, após o período de exposição ao β -glucano foi avaliado o desempenho (massa e comprimento) das larvas de tilápia do Nilo. O segundo estudo nos possibilitou avaliar o potencial de dois β -glucanos de leveduras residuais provenientes da fermentação alcoólica. Os peixes foram alimentados durante 21 dias com 1 g kg^{-1} de β -glucano e desafiados com *Aeromonas hydrophila* inativada. No terceiro estudo avaliamos a composição intestinal bacteriana de pacus alimentados com dois diferentes β -glucanos de leveduras provenientes do processo de fermentação alcoólica. Para avaliar a diversidade bacteriana intestinal, os peixes foram alimentados por 21 dias com 1 g kg^{-1} de β -glucano, o DNA da microbiota intestinal extraído e realizado o sequenciamento (16S rDNA) utilizando a plataforma Illumina MiSeq. Os resultados do primeiro experimento demonstraram que as larvas incubadas com β -glucano apresentaram melhor desempenho, sendo maiores e mais pesadas que às do tratamento controle. Os resultados do nosso segundo estudo indicaram que um dos β -glucanos obtidos de leveduras residuais da produção de álcool avaliado foi eficaz como imunoestimulante, apresentando efeito positivo na ativação da atividade respiratória dos leucócitos. Os resultados observados no terceiro experimento demonstraram grande prevalência em todos os tratamentos dos gêneros *Cetobacterium*, *Plesiomonas* e *Epulopiscium*, os quais representam aproximadamente 60% de todos os gêneros identificados. Pesquisas utilizando diferentes moléculas de β -glucano são de grande importância e necessárias para averiguar a eficácia e fundamentar a utilização comercial dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: imunoestimulantes, microbiota intestinal, ovos, pacu, prebióticos, tilápia do Nilo, β -glucano

ABSTRACT:

β -glucan is a molecule studied as a feed additive in fish farming for several years and is described in literature as immunostimulating, and acting positively in several ways, such as growth, resistance to pathogens, expression of innate immune system genes, among other parameters. In the present study, different approaches of use with different β -glucan molecules were evaluated. In the first study, we evaluated the effects of β -glucan bath solution (100 mg L^{-1}) for 8 days, after the exposure period to β -glucan we evaluated the performance (mass and length) of Nile tilapia larvae. The second study allowed us to evaluate the potential of two yeast β -glucans from alcoholic fermentation. Fish were fed for 21 days with 1 g kg^{-1} of β -glucan and challenged with inactivated *Aeromonas hydrophila*. In the third study we evaluated the bacterial intestinal composition of pacu fed with two different yeast β -glucans from the alcoholic fermentation process. To evaluate intestinal bacterial diversity, the fish were fed during 21 days with 1 g kg^{-1} of β -glucan, the DNA of intestinal microbiota was extracted and sequencing (16S rDNA) was performed using the Illumina MiSeq platform. The results of the first experiment demonstrated that the larvae incubated with β -glucan presented better performance, being bigger and heavier than those of the control treatment. The results of our second study indicated that one of the β -glucans obtained from residual yeasts from the alcohol production evaluated was effective as an immunostimulant, with a positive effect on the activation of the leukocyte respiratory activity. The results observed in the third experiment showed a high prevalence in all treatments of the genera *Cetobacterium*, *Plesiomonas* and *Epulopiscium*, which represent approximately 60% of all genera identified. Research using different β -glucan molecules is of great importance and necessary to ascertain the efficacy and substantiate the commercial use of them.

KEYWORDS: immunostimulants, intestinal microbiota, eggs, pacu, prebiotics, Nile tilapia, β -glucan

INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de peixes tem crescido constantemente nas últimas cinco décadas, com aumento médio anual de 3,2%, ultrapassando o crescimento populacional mundial em 1,6%. O consumo global per capita de peixes aumentou de 9,0 kg em 1961 para 20,2 kg em 2015, a uma taxa média de crescimento de 1,5% ao ano. Estimativas preliminares para 2016 e 2017 apontam para um crescimento de 20,3 e 20,5 kg per capita, respectivamente. Este impressionante desenvolvimento tem sido impulsionado por uma combinação do crescimento populacional, aumento da renda, urbanização e forte expansão da produção de peixes (FAO, 2018).

Neste contexto, o Brasil apresenta vantagens para o desenvolvimento da piscicultura. Com cerca de 5,5 milhões de hectares em reservatórios naturais e artificiais de água doce, clima favorável, terras disponíveis e mão de obra relativamente barata, bem como pacotes tecnológicos já finalizados algumas espécies potencialmente produtivas. A produção brasileira de pescado continental atingiu, em 2017, 691.700 mil toneladas, com um incremento de aproximadamente 8% em relação a 2016, demonstrando um crescimento consistente desse setor no Brasil (Baptista et al., 2018).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é o peixe mais produzido no Brasil, e sua criação fez com que o país aumentasse sua produção de pouco mais de 12 mil toneladas em 1995 para 219 mil toneladas em 2015 (FAO, 2016). Em termos de produção regional, a região Sul é responsável por 42% da produção, seguida pelas regiões Sudeste (26%), Nordeste (24%) e Centro-Oeste (8%). O crescimento observado nas últimas décadas na tilapicultura alavancou o país ao posto de quarto maior produtor mundial de tilápia, atrás somente da China, Egito e Indonésia (Schulter e Vieira-Filho, 2017).

A tilápia é uma das espécies mais indicadas para a criação intensiva por ser onívora, de rápido crescimento, aceitar vários tipos de alimento, dócil em várias fases da criação e por apresentar rusticidade, com fácil domínio da sua reprodução e bom rendimento de carcaça, além de adaptabilidade em diversas condições de criação. A espécie apresenta ainda requisitos exigidos pelo mercado consumidor, tais como, carne branca de textura firme, sabor delicado, de

fácil filetagem, ausência de espinhas em Y, características estas, que a colocam entre as principais espécies comerciais do mundo (Jory et al., 2000).

Dentre os peixes nativos produzidos no Brasil, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um dos que mais se destaca, ocupando a segunda posição no ranking brasileiro. Nativo das bacias dos rios Paraná, Uruguai e Paraguai, ressaltase entre as espécies por apresentar características zootécnicas desejáveis, como carne saborosa e de alto valor comercial, hábito alimentar onívoro e em sistema produtivo aceita bem dietas artificiais, possui rápido crescimento e rendimento no processamento de 46,73% de filé sem pele; 16,57% de cabeça e 88,98% de rendimento de carcaça (Vaz et al., 2000; Jomori et al., 2003; Faria et al., 2003; Bittencourt et al., 2010; Silva et al., 2012; Valladão et al., 2018). Frente ao exposto, a espécie é amplamente produzida em todas as regiões do Brasil.

Segundo dados do último Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, a produção brasileira de pacu e patinga no Brasil em 2016 foi de 13.065 toneladas (IBGE, 2016). Todavia, a intensificação da criação tem levado ao aparecimento de diversos organismos patogênicos, causando grandes prejuízos econômicos, uma vez que podem resultar em altas taxas de mortalidade e lesões que tornam a comercialização do peixe inviável, além do impacto negativo na conversão alimentar que ocasiona redução do crescimento e desempenho dos peixes (Luque, 2004; Takemoto et al., 2004; Pavanelli et al., 2008; Tavares-Dias e Martins, 2017).

No Brasil, a aquicultura, apesar do constante crescimento, vem enfrentando entraves na produção e comercialização do pescado por problemas relacionados às enfermidades, as quais provocam danos, muitas vezes irreversíveis, aos tecidos dos peixes e uma elevada taxa de mortalidade, com consequentes prejuízos econômicos (Sebastião et al., 2015).

Neste contexto, é necessário estabelecer formas adequadas para controlar e prevenir os surtos de doenças na produção. O conceito de alimento funcional é um paradigma emergente na aquicultura, o qual objetiva a formulação de dietas equilibradas, complementadas com aditivos que melhorem a saúde e resistência às doenças dos peixes (Gatlin e Li, 2004). Dentre os aditivos mais promissores que vêm sendo utilizado nas dietas de peixes, encontram-se os imunostimulantes, substâncias químicas, sintéticas ou biológicas, capazes de aumentar a resistência

do animal às doenças infecciosas, atuando no sistema imune inato, através do aumento da atividade fagocítica e bactericida das células de defesa. O uso de imunostimulantes é um meio efetivo de aumentar a imunocompetência e a resistência às infecções causadas por vírus, fungos, bactérias e parasitos (Mulero et al., 1998; Sakai, 1999; Bricknell e Dalmo, 2005).

Entre os imunostimulantes que vêm apresentando efeitos benéficos em peixes, encontra-se o β -glucano, formado por uma cadeia linear de poliglicoses, derivado de leveduras, também podendo ser encontrado em alguns cereais, principalmente aveia e cevada (Robertsen, 1999; Meena et al., 2013). Os β -glucanos podem ser diferenciados pela forma como as moléculas de glicose estão ligadas entre si. Na maior parte dos polissacarídeos, as moléculas de glicose estão unidas por ligações α -1,4, conferindo-lhes uma estrutura linear, já nos β -glucanos estas moléculas unem-se por ligações β -1,3 e β -1,6 o que lhes confere uma estrutura helicoidal. Esta conformação estrutural é reconhecida por componentes do sistema imune e resulta na ativação deste sistema (Robertsen et al., 1990).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando o β -glucano como um potente imunostimulante. Os resultados destas demonstram que o uso do β -glucano atua positivamente de diversas formas, como no crescimento (Kühlwein et al., 2014; Pilarski et al., 2017), sobrevivência e resistência à patógenos (Das et al., 2009; Sang e Fotadar, 2010; Pilarski et al., 2017), na produção de anticorpos (Kamilya et al. 2006), na alteração da microbiota intestinal (Petit e Wiegertjes, 2016; Miest et al., 2016; Jung-Schroers et al., 2016), na expressão dos genes relacionados ao sistema imune inato (Lokesh et al., 2012; Pietretti et al., 2013; Miest et al., 2016; Salah et al., 2017) e na melhora da cicatrização (Przybylska-Diaz et al., 2013; Schmidt et al., 2015) em várias espécies de peixes.

O β -glucano tem sua atuação principal na imunidade inata, por meio da estimulação da atividade fagocitária, que ocorre pela ligação do imunostimulante com receptores presentes em macrófagos e outras células de defesa (Engstad et al., 1992; Gantner et al., 2003; Herre et al., 2004). Estudos apontam vários tipos de receptores para o β -glucano presentes em macrófagos (receptores scavengers, receptores complemento CR3, lactosilceramidas, receptores dectin-1, receptores Toll-like), porém, os mecanismos exatos de ação ainda não estão completamente elucidados (Meena et al., 2013). Detalhes de como os imunostimulantes, como o

β -glucano, podem ativar os receptores de macrófagos em pacus são desconhecidos, devido à falta de pesquisas sobre as interações ligante-receptor nesta espécie.

O produto comercial Macrogard[®] é fonte de 1,3/1,6 β -glucano altamente purificado, exposto e preservado, produzido a partir de uma cepa especialmente selecionada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo considerado o β -glucano mais estudado no mundo. Inúmeros trabalhos científicos comprovam sua capacidade de promover resistência e saúde aos animais. A célula intacta da levedura tem pouca ou nenhuma capacidade de ativar o sistema de defesa, uma vez que os β -glucanos biologicamente ativos estão contidos no interior da parede celular, cobertos por componentes (manoproteínas), que não são removidos pelo processo natural de digestão do trato gastrointestinal dos animais. Portanto, para criar um produto biologicamente ativo, esses componentes de superfície têm de ser removidos em um processo tecnológico exclusivo e complexo em que, através de diversas etapas de extração consegue-se liberar e expor a estrutura preservada dos 1,3/1,6 β -glucanos em sua forma ativa (Biorigin, 2018).

Porém, o tempo do processo e custo de produção do Macrogard[®] ainda é um fator limitante à ampla disseminação e aproveitamento dos benefícios do uso deste imunoestimulante pela maioria das pisciculturas. Criar fontes alternativas mais acessíveis para este tipo de tecnologia é desejável para o desenvolvimento de uma piscicultura nacional mais competitiva e saudável.

Uma alternativa para a produção de 1,3/1,6 β -glucanos com custo reduzido seria o uso de leveduras residuais responsáveis pela fermentação na produção de álcool nas usinas. A levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é usada como fermento para a obtenção de álcool a partir da cana-de-açúcar e pode ser considerada um resíduo da produção de álcool. De cada litro produzido, sobram cerca de 30 gramas de levedura seca (Costa, 2004). A produção brasileira anual de álcool na safra 2016/2017, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017) foi de aproximadamente de 27,8 bilhões de litros, sendo o resíduo de biomassa de leveduras está perto de 834 mil toneladas.

Neste contexto, a empresa nacional “Biorigin” está desenvolvendo um produto, ainda não comercial e não testado, baseado na produção de 1,3/1,6 β -glucano extraído de leveduras residuais provenientes da produção de álcool. A utilização de leveduras residuais, além de possibilitar a redução do custo de

produção e, como consequência um produto final mais barato, está alinhada às novas demandas do mercado para o desenvolvimento de produtos ecologicamente corretos, uma vez que utiliza material residual. Pesquisas utilizando este novo produto serão de grande importância e necessárias para averiguar sua eficácia como imunoestimulante e fundamentar a utilização comercial do mesmo.

MANUSCRITO I

SHORT COMMUNICATION

An early β -glucan bath during embryo development increases larval size of Nile tilapia

Raphael B. de Jesus ^a, Jules Petit ^b, Fabiana Pilarski ^a, Geert F. Wiegertjes ^{b,c}, João Fernando A. Koch ^d, Carlos A. F. de Oliveira ^d and Fábio S. Zanuzzo ^{a*}

^a Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP - Univ Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

^b Cell Biology and Immunology Group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands

^c Aquaculture and Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands

^d Department of Research and Development, Biorigin Company, Fazenda São José s/n, 17290-000 Macatuba, São Paulo, Brazil

*corresponding author: Fábio Sabbadin Zanuzzo

E-mail address: fabioszanuzzo@gmail.com

Current address: Department of Ocean Sciences and Biology, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada A1C5S7.

Paper was resubmitted with the requested corrections to Aquaculture Research

30/01/2019

Abstract

Larvae production is considered a 'bottle neck' for many aquaculture species and early life history plays a key role in this process. Although considerable research has been conducted in different fields to improve fish larvae productivity, very few reports have investigated methods to improve embryo development and consequently larvae quality/production. Here, we show that β -glucan bathing during the embryo development and yolk sac larvae absorption phase enhances the larvae growth (mass and length) of Nile tilapia and this is the first report of this nature on fish larvae culture. We discuss the possibility that microbiota may be the key to understanding the action of β -glucan on the size of Nile tilapia larvae. However, further studies should be designed to address this finding. In summary, it is an innovative approach and a novel use of β -glucan in the aquaculture industry, and could potentially represent a new research field to improve fish embryo/larvae culture.

Keywords

Fish larvae; hatching; immunostimulant; Nile tilapia; prebiotics

1. Introduction

The demand to improve fish farming has increased exponentially in the last several decades and larvae production is crucial in this process. High mortality of embryos and larvae is a common phenomenon in fish, and causes a significant financial loss annually in the aquaculture industry (Jiang et al., 2016). Thus, methods/procedures to improve embryo development, and fish larvae culture are necessary.

Several studies have shown that the use of β -glucan has positive effects in fish production such as promoting growth (Misra et al., 2006; Kuhlwein et al., 2014; Pilarski et al., 2017), improving wound healing (Przybylska-Diaz et al., 2013) and increasing survival and resistance to pathogens (Das et al., 2009; Meena et al., 2013; Sang and Fotedar, 2010; Petit and Wiegertjes, 2016). Studies using β -glucan during the first larval feeding have shown positive results on parameters such as survival, the expression of genes involved in metabolism and immunity, and the beneficial modulation of intestinal microbiota (Skjermo et al., 2006; Miest et al., 2016). In this study, we investigated the effects of β -glucan bathing during the embryo development and larvae phase until absorption of the yolk sac, on larvae performance post-absorption of the yolk sac. Although β -glucan has been widely studied in fish, the present work represents one of the few studies investigating the use of β -glucan bathing during fish larvae production and the first to evaluate the performance of larvae from embryos incubated with β -glucan.

2. Material and methods

2.2. Broodstock husbandry and embryo collection

The embryos were obtained from the Laboratory of Tilapiculture of Aquaculture Center of Unesp (Jaboticabal, SP, Brazil). The broodstock (GIFT tilapia) were 1.5 years old and were fed with commercial feed (crude protein 28%, crude lipid 4%, crude fiber 10%, ash 14%), (Presence, Nutripiscis SI, Brazil), three times per day (08h00, 11h30 and 17h00) at a ratio of 3% body mass/daily. The broodstock were held in 7000 L circular flexible PVC laminate tanks connected to the water recirculation system with mechanical and biological filters, continuous aeration. The photoperiod was 12h00 light : 12h00 dark. The ratio of females to males was 3:1. The eggs were naturally fertilized and collected by the counterflow

of water with the aid of a spruce from maternal oropharyngeal cavities of 5 different females.

2.2. *Experimental procedure*

A pool containing 3,300 embryos at a similar stage of ontogenic maturation (uniformly yellow eggs) were collected, as described above, and redistributed into 6 individual incubators (550 embryos in each incubator) supplied with a recirculation water flow system and photoperiod of 12h00 light, 12h00 dark. Each incubator (2.5 L) had an individual pump (62 L h⁻¹; AT-201, Chuangxing Electrical Appliances, Hong Kong, China) placed on a reservatory tank (70 L) equipped with a thermostat (H-606, Hopar[®], Dantu Zhenjiang, China) and the water from incubators returned to the reservatory tank by gravity. Two systems completely independent with 3 incubators each were used. One system received the MacroGard[®] (source of β -glucan, concentration > 60%, Biorigin, SP, Brazil) at a dose of 100 mg L⁻¹ (added in water) and the other system was used as a control. The experimental period with exposure to β -glucan lasted 5 days for embryo development and more 3 days after hatching when the larvae completed the absorption of the yolk sac. Immediately after this period, larvae were collected from each experimental replicate (n = 30), anesthetized with benzocaine (0.1 g L⁻¹), excess water was removed using paper towels and biomass was obtained on a precision scale (Bel Engineering, São Paulo, Brazil). For the measurement of length, photos of the larvae (n = 24) were used and measured individually with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Springs, Maryland, USA).

During the experimental period, temperature (control $28.13 \pm 1.15^{\circ}\text{C}$, and β -glucan $27.65 \pm 1.12^{\circ}\text{C}$), pH (control 8.07 ± 0.06 , and β -glucan 8.03 ± 0.15), oxygen (control $5.27 \pm 0.32 \text{ mg L}^{-1}$, and β -glucan $5.51 \pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$) and conductivity (control $268.50 \pm 23.39 \mu\text{S/cm}$, and β -glucan $282.75 \pm 20.50 \mu\text{S/cm}$) were monitored daily with a multiparameter probe (W23-XD, Horiba, Japan). No significant ($P > 0.05$) differences were observed in water parameters between treatments (temperature, $P = 0.579$; pH, $P = 0.488$; oxygen, $P = 0.327$; conductivity, $P = 0.432$).

2.3. Statistical analyses

All data were analyzed for normality (Cramer-von Mises) and homoscedasticity (Brown-Forsythe). The larvae length and mass were analyzed using t-tests and $P < 0.05$ was used as the level of statistical significance in all analyses. Values in the text and figures are presented as the means $\pm$ 1 standard error (S.E.) of the mean.

2.4. Animal welfare statement

The experiment was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, under protocol number 016057/17. The approval was consistent with the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

3. Results

Larvae from embryos incubated with β -glucan significantly increased in mass (Fig. 1 A) and length (Fig. 1 B) compared with larvae from the control group ($P < 0.05$). Larvae that received the β -glucan treatment were ~20% heavier (10.2 mg - Control; 12.3 mg - β -glucan) and ~8.5% longer (0.82 cm - Control; 0.89 cm - β -glucan) compared to the control larvae. Both treatments had a similar embryo viability rate of ~ 90%.

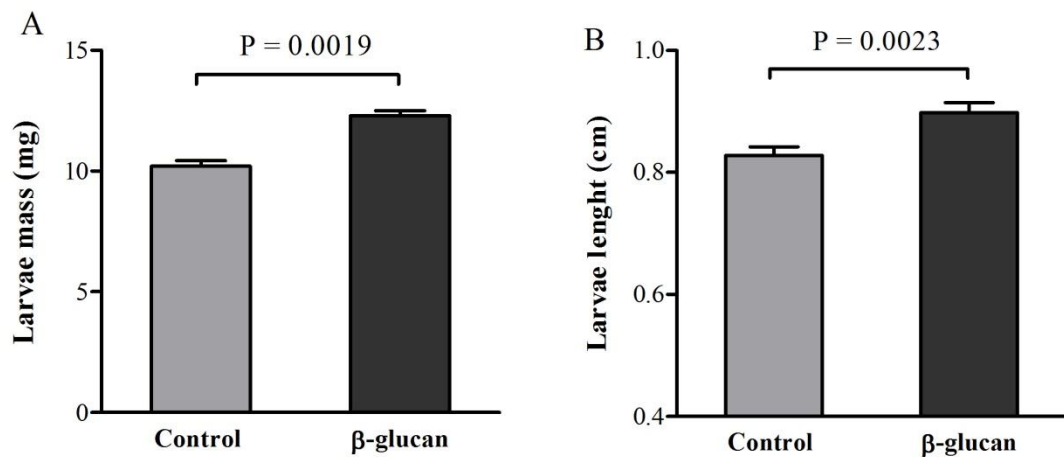


Figure 1. Larvae mass (A, n = 30) and length (B, n = 24) from embryos incubated with β -glucan at a dose of 100 mg/L and control. Values are presented as the means $\pm$ 1 standard error (S.E.) of the mean.

4. Discussion

Recently, extensive studies in the field of feeding efficiency and health have been addressed to improve fish production, but comparatively few reports have addressed the early life stages such as embryo development and larvae production. Here, we evaluated the effects of β -glucan bathing during the embryo development phase on larvae performance. The results showed that larvae incubated with β -glucan were larger and heavier than the control. These findings are relevant to the aquaculture industry and suggests a novel method for improving fish larvae production.

Strand and Dalmo (1997) bathing larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) with 25 mg L⁻¹ of radioactive and fluorescein-labelled Laminaran (source of β -glucan from brown algae) observed the presence of labelled Laminaran in the yolk sac and also in the posterior intestinal epithelial layer. This result confirmed the translocation of β -glucan through water to the yolk sac and into the intestine of the larvae. The prebiotic effect of β -glucan on fish intestinal microbiota is already well known. β -Glucans promote the improvement/diversity of beneficial intestinal microbes as lactic acid bacteria and reduce the frequency of disease/inflammation resulting from pathogenic bacteria (Kuhlwein et al., 2013; Jung-Schroers et al., 2016; Miest et al., 2016). Several studies have demonstrated the positive effect of lactic acid bacteria on the bone development of fish larvae

(Aubin et al., 2005; Avella et al., 2010; Lamari et al., 2013). Moreover, Miest et al. (2016) observed in turbot larvae fed with MacroGard® a higher expression of the osteocalcin gene, in which the transcription of protein is responsible for bone mineralization. As β -glucan is not considered a nutritional feed, the authors suggested that the increased expression of the osteocalcin gene is a secondary effect of changing the intestinal microbiota caused by β -glucan. Herein, we suggest that the best performance observed in larvae from embryos incubated with β -glucan may be related to the entry of this compound through the yolk sac and consequent alteration of the intestinal microbiota modulating the expression of the osteocalcin gene.

Kiseleva et al. (2014) applied β -glucan bathing at a concentration of 0.5 mg m L⁻¹ for 3 min during eggs fertilization of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). The authors observed a weight gain of up to 40-55% in juveniles 3.5 months after hatching compared with the control group. They suggested that the increase in the survival rate and decrease in susceptibility to *Saprolegnia* infection by up to 2.5-fold led to this weight gain. Herein, β -glucan bathing was applied with a different approach and method, but even using different methods and species, the use of β -glucan bathing during embryo development or the fertilization of eggs corroborates in enhancing of larvae and juvenile performance.

The design of our experiment does not allow for distinguishing if the application of β -glucan bathing during the embryo development phase or post-hatching or both were responsible for the increase in larvae performance. However, additional experiments are being designed to specify this as well the mechanisms behind the finding, the minimum dose required to obtain significant results and the further development of the larvae. Although β -glucan is a product with a relatively high cost, the low concentration used and low water volume required during fish larvae production demonstrates an economic viability due to the significant positive results on larvae weight and size. Moreover, we highlight the innovative application for β -glucan and the novel method to improve larvae culture. Finally, it is important to emphasize that β -glucan is a natural compound with an environment-friendly approach in modern aquaculture.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dra. Teresa Cristina R. D. Koberstein and the technician Luiz Fernando de Souza for the technical support and management of the fish breeding, Biorigin for the MacroGard® donation, intellectual and financial support.

This research was part of the Joint Research Projects BioBased Economy NWO-FAPESP Programme (Project number 729.004.002) funded by the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) and São Paulo Research Foundation, Brazil (FAPESP, grant 2013/50418-1).

5. References

Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* 36, 758-767.

Avella, M.A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A.R., Carnevali, O., 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: A molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Am. J. Physiol.* 298, R359-R371.

Das, B.K., Debnath, C., Patnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Misrhra, B.K., 2009. Effect of beta-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish Shellfish Immun.* 27, 678-683.

Jiang, C., Wang, P., Li, M., Liu, S., Zhang, S., 2016. Dietary beta-glucan enhances the contents of complement component 3 and factor B in eggs of zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 107-113.

Jung-Schroers, V., Adamek, M., Jung, A., Harris, S., Dóza, Ö.S., Baumer, A., Steinhagen, D., 2016. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac. Nutr.* 22, 1026-1039.

Kiseleva, M., Balabanova, L., Elyakova, L., Rasskazov, V., Zvyagintseva, T., 2014. Effect of treatment of chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) eggs with

1,3;1,6-beta-D-glucans on their development and susceptibility to *Saprolegnia* infection. J. Fish Dis. 37, 3-10.

Kuhlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D., Davies, S.J., 2014. Effects of dietary beta-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Anim. Physiol. An. N. 98, 279-289.

Kuhlwein, H., Emery, M.J., Rawling, M.D., Harper, G.M., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2013. Effects of a dietary beta-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Appl. Microbiol. 115, 1091-1106.

Lamari, F., Castex, M., Larcher, T., Ledevin, M., Mazurais, D., Bakhrouf, A., Gatesoupe, F.-J., 2013. Comparison of the effects of the dietary addition of two lactic acid bacteria on the development and conformation of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and the influence on associated microbiota. Aquaculture. 376-379, 137-145.

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiol. Biochem. 39, 431-457.

Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, T.B., 2016. Dietary beta-glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. Fish Shellfish Immun. 48, 94-104.

Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary beta-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture. 255, 82-94.

Petit, J., Wiegertjes, G.F., 2016. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 93–102.

Pilarski, F., Ferreira de Oliveira, C.A., Darpossolo de Souza, F.P.B., Zanuzzo, F.S., 2017. Different beta-glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immun.* 70, 25-29.

Przybylska-Diaz, D.A., Schmidt, J.G., Vera-Jiménez, N.I., Steinhagen, D., Nielsen, M.E., 2013. β -glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immun.* 35, 998–1006.

Sang, H.M., Fotadar, R., 2010. Effects of dietary beta-1,3-glucan on the growth, survival, physiological and immune response of marron, *Cherax tenuimanus* (smith, 1912). *Fish Shellfish Immun.* 28, 957-960.

Skjermo, J., Storseth, T.R., Hansen, K., Handa, A., Oie, G., 2006. Evaluation of beta-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-glucans and high-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture.* 261, 1088-1101.

Strand, H.K., Dalmo, R.A., 1997. Absorption of immunomodulating β (1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.* 20, 41-49.

MANUSCRITO II

β -Glucan isolated from alcohol yeast waste enhances the leukocyte respiratory burst of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after *Aeromonas hydrophila* inoculation

Raphael Barbetta de Jesus ^a, Fábio Sabbadin Zanuzzo ^a, Jules Petit ^b, João Fernando Albers Koch ^d, Carlos Alberto Ferreira de Oliveira ^d, Elisabeth Criscuolo Urbinati ^a, Geert Frits Wiegertjes ^{b,c} and Fabiana Pilarski ^{a*}

^a São Paulo State University (UNESP), Aquaculture Center of Unesp (CAUNESP).
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

^b Cell Biology and Immunology Group, Wageningen Institute of Animal Sciences,
Wageningen University, PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands

^c Aquaculture and Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal Sciences,
Wageningen University, PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands

^d Department of Research and Development, Biorigin Company, Fazenda São José s/n, 17290-000 Macatuba, São Paulo, Brazil

*corresponding author: Fabiana Pilarski

E-mail address: fabiana.pilarski@unesp.br

Current address: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Paper will be submitted to Aquaculture

Abstract

The most common sources of β -glucans are derived from the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* baker yeast, and they have been widely used as feed additive to improve immunological status in fish farming. However, the cost of baker yeast-derived immunostimulants is quite high. Exploring more affordable alternatives to produce β -glucans is desirable. An alternative for the production at reduced cost would be the use of residual yeasts used in the production of alcohol and brewer. Another promising subject to considered in this context is the technological process, cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* has different polysaccharides, and then the process of purification can result in different glucans functionalities. Taking together the potential benefits of these two concepts and given the potential benefits of β -glucan in aquaculture. Thus, the purpose of this study was to evaluate whether feeding fish with β -glucans of different levels of purification would affect their immune and stress response to heat killed *Aeromonas hydrophila* inoculation. The fish were fed with three experimental diets for 21 days, one control diet, and two diets to which 1 g kg^{-1} of different β -glucan products were added. On the 22nd day, the fish had the blood drawn by caudal puncture prior and 6 and 24 hours post inoculation with *Aeromonas hydrophila*. We measured glucose and cortisol plasma levels, leukocyte respiratory burst, serum lysozyme concentration and hemolytic activity of alternative pathway of the complement system. Our study indicates that β -glucans obtained from residual yeasts of the production of alcohol is effective as immunostimulant and can be an alternative to reduce cost of fish production, besides to be aligned with the new demands of the market for the development of ecologically correct products.

Keywords

Fish, immunostimulant, innate immunity, prebiotics, industry waste

1. Introduction

The most common sources of β -glucans are derived from the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* baker yeast, and they have been widely used as feed additive to improve immunological status and control diseases in fish farming (Miest et al., 2016; Petit and Wiegertjes, 2016; Pilarski et al., 2017; Dawood et al., 2017). *In vivo* administration of β -glucan showed increased protection against parasitic (Bridle et al., 2005; Guselle et al., 2007), bacterial (Yoo et al., 2007; Gopalakannan and Arul, 2010; Sirimanapong et al., 2015b) and viral pathogens (Lapatra et al., 1998; Sealey et al., 2007). In addition to the immunostimulant effect, β -glucan has shown a prebiotic effect, acting as a modulator of the intestinal microbiota of fish (Jung-Schroers et al., 2016; Miest et al., 2016; Petit and Wiegertjes, 2016).

β -Glucans contain pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and may be recognized by the host's cell pattern recognition receptors (PRR) eliciting an inflammatory cascade that leads to the enhancement of innate immune responses (Volman et al., 2008; Dalmo and Bøgwald, 2008). Glucans may activate leukocytes, by stimulating their phagocytic, cytotoxic, and antimicrobial activities, and the production of reactive oxygen species (ROS) (Paredes et al., 2013; Pilarski et al., 2017). In addition, β -glucans increase the production of lytic proteins such as lysozyme (Ai et al., 2007; Gopalakannan and Arul, 2009; Chang et al., 2013) and complement system proteins (Chang et al., 2013; Pionnier et al., 2014; Franco Montoya et al., 2018).

However, the cost of baker yeast-derived immunostimulants is quite high (De Oliva-Neto et al., 2016) and is still a limiting factor to the wide dissemination and exploitation of their benefits for the production of fish species with lower market or farming costs. Exploring more affordable alternatives to produce β -glucans is desirable. An alternative for the production at reduced cost would be the use of residual yeasts used in the production of alcohol and brewer. When fermentation ceases, in both cases, yeast cells are separated by centrifugation, resulting in a concentrated yeast cell suspension with 60 to 70% (wet weight basis/v) of cells (Basso et al., 2011). The use of residual yeasts, besides allowing the reduction of the cost of production and as a consequence a cheaper final product, is aligned with the new demands of the market for the development of

ecologically correct products. Once glucan amounts an average of 30% of yeast cell wall, the possibility of exploitation of residual yeast extract to animal nutrition should be carefully considered in order to prevent another kind of residual material.

Another promising subject to be considered in this context is the technological process. Cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* has different polysaccharides as glucan, mannans and chitin, as well as different combinations between them with themselves and with other compounds, like proteins, forming mainly chitin-glucan, mannan protein and glucomannan (Orlean, 2012). Then, the process of purification can result in different glucans functionalities.

Taking together the potential benefits of these two concepts (residual raw material and process) and given the potential benefits of β -glucan in aquaculture, the Research Center of Biorigin developed two waste β -glucans with different purities. Thus, the purpose of this study was to evaluate whether feeding fish with β -glucans of different levels of purification would affect their immune and stress response to heat killed *Aeromonas hydrophila* inoculation.

2. Material and methods

The protocol used in this experiment is in accordance with the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines and was approved by the Ethics Committee on the use of animals (CEUA) of the FCAV – UNESP – Jaboticabal Campus (protocol number 11336/15).

2.1 Experimental animals

A total of 162 pacu (163.0 ± 23.07 g, 16.0 ± 0.77 cm) were distributed in 9 tanks (450 L, 18 fish per tank) with aeration and open water flow. During the experimental period, the water temperature (30.3 ± 0.2 °C), pH (7.5 ± 0.06), dissolved oxygen (6.06 ± 0.90 mg L⁻¹), conductivity (0.180 ± 0.00 mS cm⁻¹), total solids (0.117 ± 0.0 g L⁻¹) and salinity ($0.01 \pm 0.0\%$) were monitored. No differences ($P > 0.05$) were observed between fish weight and length, and water parameters among the 9 tanks. The light-dark cycle was fixed at 12h00 light and 12h00 dark.

2.2 Experimental design

The experimental design was completely randomized with three treatments and three replicates (tanks). After 20 days of acclimation, the fish were fed with three experimental diets for 21 days: one control diet (no β -glucan), and two diets to which 1 g kg⁻¹ (0.1%) of different β -glucan products (see diet preparation below; BG01 and BG02) were added. On the 22nd day, the fish had the blood drawn by caudal puncture prior (n = 6) and 6 and 24 hours post inoculation (hpi) with *Aeromonas hydrophila* (n = 12). We measured glucose and cortisol plasma levels, leukocyte respiratory burst, serum lysozyme concentration and hemolytic activity of alternative pathway of the complement system.

2.3 Experimental diet

Two β -glucans isolated from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) from the alcohol-producing industry were used in this experiment: BG01 (glucan concentration = 69%, batch number = Q515244) and BG02 (glucan concentration = 56.4%, batch number = BT13_260), not yet commercially available, both developed by Biorigin (SP, Brazil). Three diets were formulated, two with β -glucans and a control diet free of β -glucan. The proportions of the ingredients and the chemical analysis of the diets are presented in Table 1. Additional information about the β -glucan samples are in supplementary Table 1 (Appendix). The diets were extruded in a single-screw extruder (Mex-250, Manzoni Industry Ltda, Brazil) at 136°C and the extruded speed regulated for pellet size of 6.71 ± 0.24 mm in diameter and 7.76 ± 0.37 mm in length. The diets were analyzed to determine dry matter, mineral matter and ether extract according to AOAC (2016). Nitrogen was determined using an LECO FP-528 nitrogen analyzer (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). The feed was offered twice a day (9:00 a.m. and 5:00 p.m.), totaling 3.0% of the live weight. No differences (P > 0.05) were observed between chemical composition among the 3 experimental diets.

Table 1. Ingredients and nutrient composition of the experimental diets.

	Control	BG01	BG02
Ingredients (g/kg DM ^a)			
Fish meal	42.6	42.6	42.6
Poultry viscera meal	74.6	74.6	74.6
Soybean bran	312.0	312.0	312.0
Corn	283.1	283.1	283.1
Wheat bran	190.0	190.0	190.0
Broken rice	50.0	50.0	50.0
Soybean oil	13.0	13.0	13.0
Antioxidant (BHT)	0.2	0.2	0.2
Dicalcium phosphate	10.0	10.0	10.0
Calcitic limestone	10.2	10.2	10.2
Vitamin-mineral supplement ^b	1.9	1.9	1.9
Choline choride	1.3	1.3	1.3
Kaolin	11.1	10.1	10.1
β-glucan	0.0	1.0	1.0
Chemical composition			
Dry matter [g/kg DM]	938.9	947.9	941.4
Crude protein [g/kg DM]	286.6	278.7	277.1
Ether extract [g/kg DM]	31.1	30.0	33.1
Crude fiber [g/kg DM]	78.6	87.1	82.6
Mineral matter [g/kg DM]	91.0	102.4	99.6
Nitrogen free extract [g/kg DM]	451.7	449.8	449.0
Crude energy [MJ/kg DM]	17.3	17.2	17.2

^a Dry matter (DM)

^b Mineral mix (Premix Nutrifish Guabi[®], Campinas, SP, Brazil) per kg of product: folic acid (1,250 mg); calcium pantothenate (12,000 mg); cupper (125 mg); iron (15,000 mg); iodine (375 mg); manganese (12,500 mg); selenium (87.5 mg); zinc (12,500 mg); cobalt (125 mg); vitamin A (2,500,000 IU); vitamin B12 (4,000 mg); vitamin B1 (4,000 mg); vitamin B2 (4,000 mg); vitamin B6 (4,000 mg); vitamin C (50,000 mg); vitamin D3 (600,000 IU); vitamin E (37,500); vitamin K3 (3,750 mg); niacin (22,500 mg); biotin (15 mg).

2.4 Sampling

Fish were euthanized by deepening the anesthetic plane with benzocaine (0.1 g L⁻¹) before blood collection. For cortisol, lysozyme and complement analyzes the whole blood was allowed to clot at room temperature for 3 h, centrifuged for 10 min at 3,000 × g and the obtained serum was stored at -80°C. Whole blood was immediately used to measure glucose concentration and heparinized blood used to measure the respiratory activity of leukocytes.

2.5 *Cortisol levels and plasma glucose*

Cortisol levels were measured by spectrophotometry using the DRG[®] Cortisol ELISA kit (EIA-1887; DRG International, Inc USA, <http://www.drginternational.com>) and concentration of glucose was measured by amperometric system using the G-TECH Free lite (Accumed-Glicomed, RJ, Brazil, <https://www.accumed.com.br>).

2.6 *Leukocyte respiratory burst (LRB)*

The production of reactive oxygen species was measured using NBT (nitrotetrazolium blue chloride, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil; #N6876), following protocol (Anderson and Siwicki, 1995), modified (Biller-Takahashi et al., 2013). An aliquot of 100 µL of heparinized blood was incubated with an equal volume of NBT buffer (0.2%) at room temperature for 30 min. Thereafter, 1 mL of dimethylformamide (DMF, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil; #227056) was added to the samples, that were read in a spectrophotometer (Model Genesys 10S, Thermo Scientific Inc., Madison, WI, USA) at 540 nm, at room temperature.

2.7 *Serum lysozyme concentration (SLC)*

Serum lysozyme concentration was determined according to Demers and Bayne (1997) with modifications by Zanuzzo et al. (2015). Briefly, standard solutions of hen egg white lysozyme (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil; #L6876) and serum samples were placed into a 96-well plate in triplicate with a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil; #M3770). After mixing, absorbance was measured at 450 nm over 10 min using a microplate reader (Model Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA) at room temperature. The rate of decrease in absorbance for each sample was then compared to that obtained with the standard curve (ng µL⁻¹).

2.8 Hemolytic activity of the alternative pathway of the complement system (ACH_{50})

Serum hemolytic activity of the complement (alternative pathway) was measured according to Zanuzzo et al. (2017) with modifications for pacu blood. Initially, a sample of rabbit blood was collected and the erythrocytes (RaRBCs) were washed and isolated. To optimize the assay, a series of dilutions (1:2, 1:3 and 1:4 in a final volume of 200 μ L) was made by mixing a pool of aliquots of all serum samples with TEA-EGTA-Mg²⁺ buffer (triethanolamine ethylene glycol tetraacetic acid; 8 mM, with 2 mM of Mg²⁺ and 0.1% gelatin, pH 7.4) and the RaRBC suspension, and measuring absorbance at 700 nm using a spectrophotometer (Model Genesys 10S, Thermo Scientific Inc., Madison, WI, USA). Based on this preliminary work, the assay was carried out with a 1:2 dilution at 25°C. Hemolytic complement activity (ACH_{50}) of each sample was measured as the time (seconds) required for the initial optical density to be reduced by one-half (50% of RaRBC hemolysis by the alternative pathway).

2.9 Preparation of *A. hydrophila* and inoculation

A. hydrophila strains isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (strain T3R), and identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene (GenBank accession no. MH591949.1), were grown in TBS medium (Triplic Soy Broth, Sigma-Aldrich, MO, USA) and incubated at 28°C for 24 h, after this time the medium was centrifuged at 4°C for 10 min at 3.000 $\times$ g, the bacterial cells were washed twice with PBS buffer (0.01 M) under the same conditions and re-suspended in the same buffer.

The fish were immunologically challenged by intraperitoneal inoculation. Their mass was recorded and they were given 10 μ L g⁻¹ of intraperitoneal injection of *A. hydrophila* inactivated in a water bath at 40°C for 30 min (Bozzo et al., 2007) at the concentration of 7 $\times$ 10⁷ CFU mL⁻¹. Inactivation of bacteria was performed to stimulate the immune system of fish, and to avoid mortality.

2.10 Statistical analysis

Values were identified as outliers if they were >3 or <-3 of the studentized x predicted y , and only 7 values were removed from the analyses. Further, some of the data were transformed prior to statistical analysis as they failed normality (Cramer Von Mises) and/or homoscedasticity tests (Brown–Forsythe). Further, the experiment was analyzed as a two-way ANOVA [3 (treatments) $\times$ 3 (initial, 6 and 24 hpi)], followed by Duncan's new multiple range test post-hoc tests. $P < 0.05$ was used as the level of statistical significance in all analyses. Values in the figures are means $\pm$ 1 standard error (S.E.) of the mean.

3. Results

No fish mortality was observed during the experimental period and fish from all treatments were fed adequately, ingesting 3.0% of the daily live weight. There were neither treatment effect ($P = 0.69$; $F = 0.36$, Fig. 1A) nor interaction between treatment and sampling points for cortisol levels ($P = 0.17$; $F = 1.63$, Fig. 1A). We only observed elevation in plasma cortisol levels ($P < 0.05$, Fig. 1A) at 24 hpi. Similar to cortisol, there were neither treatment effect ($P = 0.90$; $F = 0.23$, Fig. 1B) nor interaction between treatment and sampling points for glucose levels.

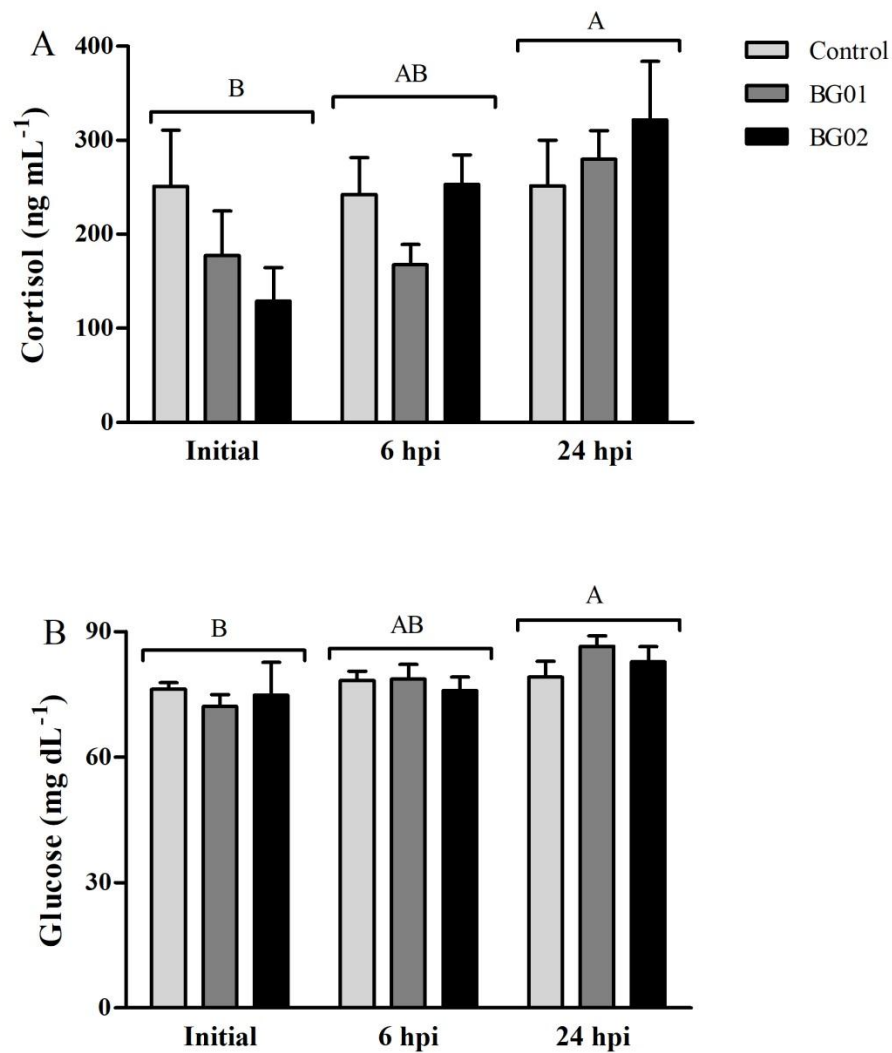


Figure 1. Plasma cortisol (A) and glucose (B) levels in pacu after 21 days feeding a control diet and diets supplemented with 0.1 g kg⁻¹ BG01 (69% concentration) or BG02 (56.4% concentration), before (initial, N = 6) and 6 and 24 hours post inoculation (hpi, N = 12) with *Aeromonas hydrophila*. Different capital letters indicate differences between sampling points ($P < 0.05$).

Regarding LRB values, we observed interaction between treatment and sampling points ($P = 0.02$; $F = 3.24$, Fig. 2A). BG02 values increased 6 hpi, and differed positively from control and BG01, up to 24 hpi. There was difference ($P < 0.05$, 24 hpi) between sampling points; LRB increased in relation to the initial and 6 hpi samplings.

No interaction between treatment and sampling points was observed for SLC ($P = 0.68$; $F = 0.57$, Fig. 2B), and no difference was seen between treatments

($P = 0.97$; $F < 0.0001$, Fig. 2B). However, at 6 hpi (independent on the treatment), fish had higher values of SLC ($P < 0.05$, Fig. 2B) compared to the initial point, which reduced at 24 hpi, returning close to initial values.

Regarding the ACH_{50} , we did not observe neither interaction between treatment and samplings ($P = 0.36$; $F = 1.10$, Fig. 2C) nor effect of treatments ($P = 0.62$; $F = 0.03$, Fig. 2C), however ACH_{50} improved ($P < 0.05$) at 24 hpi compared to initial sampling.

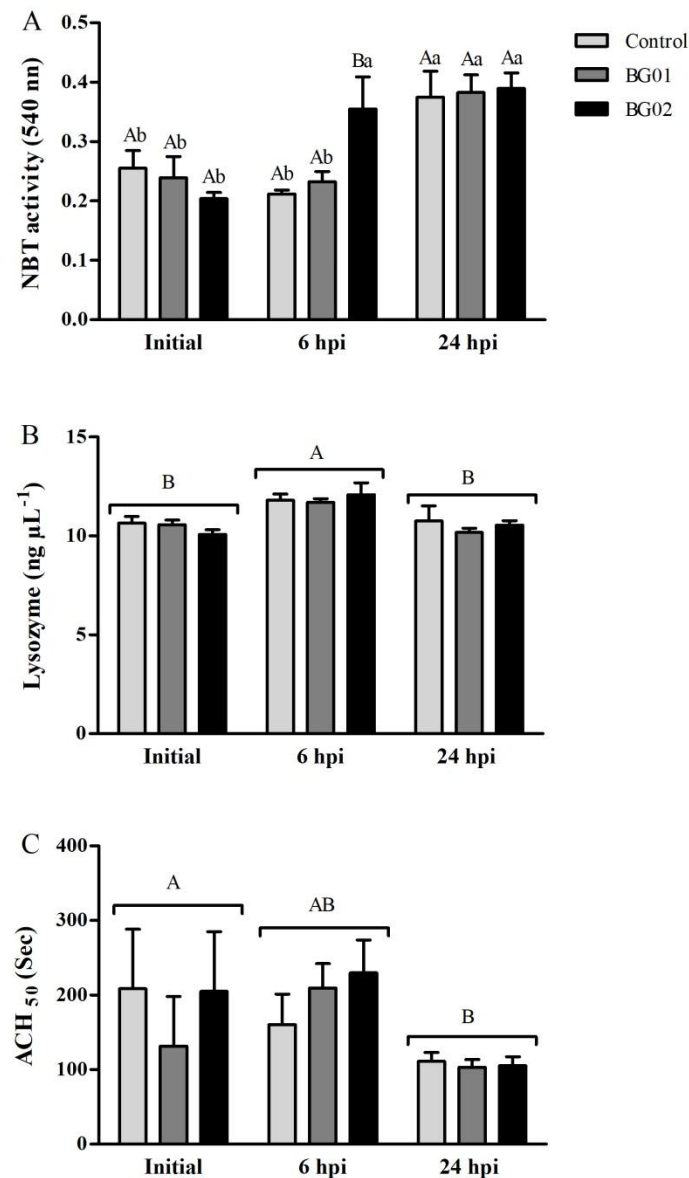


Figure 2. Leukocyte respiratory burst (A), serum lysozyme concentration (B) and hemolytic activity of the alternative pathway of the complement system (ACH_{50}) in pacu after 21 days feeding a control diet and diets supplemented with 0.1 g kg^{-1}

BG01 (69% concentration) or BG02 (56.4% concentration), before (initial, N = 6) and 6 and 24 hours post inoculation (hpi, N = 12) with *Aeromonas hydrophila*. Different capital letters indicate differences between diets at a given time point, whereas different lower case letters indicate a difference between sampling points within a group ($P < 0.05$). Different capital letters indicate differences among sampling points diets ($P < 0.05$) for serum lysozyme concentration and ACH_{50} since that no significant ($P < 0.05$) effect was observed for treatments. Values are means $\pm$ 1 standard error (S.E.).

4. Discussion

Many studies have demonstrated the positive effects of dietary β -1.3/1.6-glucan on fish, but few studies have compared and exploited different molecules and their activity (Vetvicka and Vetvickova, 2014; Pilarski et al., 2017; Franco Montoya et al., 2018). In our study we tested two β -glucan molecules with different degrees of concentration, BG01 and BG02, and, in general, both showed similar activities, except by the BG02 (less concentrated) which improved the LRB, 6 hpi, in comparison to BG01 and the control treatment. In addition, we detected an activation of the innate immune system by the *A. hydrophila* inoculation. The inoculum increased cortisol levels 24 hpi, when LBR and ACH_{50} were activated. This activation was reflected in the higher levels of blood glucose observed at this sampling point. The lysozyme concentration increased earlier, 6 hpi.

During the phagocytosis of pathogens, leukocytes increase oxygen uptake through NADPH oxidase and generate several reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2) and the hydroxyl radical ($OH^\cdot$) in a process called leukocyte respiratory burst. Superoxide and hydrogen peroxide are very toxic ROS and form a potent antibacterial system (Klebanoff, 1999). Several studies have shown that the dietary administration of 1.3/1.6 β -glucan stimulated the LRB in *Oreochromis niloticus* (Pilarski et al., 2017), *Pangasianodon hypophthalmus* (Sirimanapong et al., 2015a), *Lutjanus guttatus* (Del Rio -Zaragoza, Fajer-Ávila and Almazán-Rueda, 2011), *Acipenser persicus* (Aramli et al., 2015). In our study, BG02 had a positive effect on LRB (6 hpi).

One fact to be considered is that BG02, which presented less concentrated, presented 5.09 times more mannans than BG01 (Supplementary Table 1), what can have contributed for the positive effect on LRB. Mannan oligosaccharide (MOS) is a glucomannoprotein complex derived from the cell walls of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (Sang and Fotedar, 2010). The immunostimulant effect of MOS in fish is already described (Carbone and Faggio, 2016). Some studies have demonstrated the effect of MOS on parameters such as macrophage phagocytic activity (Torrecillas et al., 2011), leukocyte counts (Ebrahimi et al., 2012), phagocytic activity of head kidney leukocytes (Torrecillas et al., 2007; Torrecillas et al., 2011), all related to the LRB, what reinforces the result of BG02 that we found in pacu. The effect of MOS as immune modulator is probably based in the activation of pattern recognition receptors (PRR) and proteins (PRP), as the mannose receptor (MR) that is an endocytic receptor expressed by macrophages and by endothelial cells that recognize both self-glycoproteins and microbial glycan ligands, triggering the innate immune system in response to a non-self-substance (Torrecillas et al., 2014; Carbone and Faggio, 2016).

Serum lysozyme is an important molecule of the innate immune system in fish (Saurabh and Sahoo, 2008). It hydrolyzes chemical bonds between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine present in the peptidoglycan of bacterial cell walls. It is capable of cleaving some Gram-positive bacteria and, along with the complement system, even some Gram-negative bacteria (Paulsen et al., 2001; Gómez and Balcázar, 2008). The SLC was not affected by the β -glucan treatments, but there was a significant increase in SLC (6 hpi). Similarly, in pacu fed with 0.1% β -glucan for 7 days, Biller-Takahashi et al. (2014) did not observe difference in SLC levels, but only after experimental infection with *A. hydrophila*. Absence of effect of β -glucan (0.0, 0.2, 0.6 and 1.8%) was also described by Kunttu et al. (2009) after feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during 21 days. Although some studies have reported elevation in SLC by effect of β -glucan (Sirimanapong et al., 2015a; Aramli et al., 2015; Franco Montoya et al., 2017), modulation of lysozyme by fungi or components of fungal structures may be limited. Comparing, *in vivo*, SLC between *A. hydrophila* infection (Das et al. 2009) and the *Saprolegnia parasitica* fungus (Das et al., 2013) in *Anabas testudineus*, the authors suggested that lysosomal enzymes produced

by the leukocyte cell suspension may be spared to counteract the fungal challenge (Das et al., 2013).

The complement system comprises more than 35 soluble plasma proteins that are critical for the innate and adaptive immunity of fish. Activation of the complement system initiates a cascade of biochemical reactions followed by the generation of biologically active mediators that act against the antigens via lysis of its cellular membrane and on the activation of nonspecific mediators of the inflammation. Additionally, the complement system has an important role between innate and adaptive immune responses (Holland and Lambris, 2002; Gómez and Balcázar, 2008). Although BG01 and BG02 did not activate ACH₅₀, the inoculation with *A. hydrophila* did it 24 hpi. Franco Montoya et al. (2017) fed matrinxã (*Brycon amazonicus*) with β -glucan (0.1%) during 15 days and did not observe changes in ACH₅₀ compared to control group before the fish exposure to *A. hydrophila*. Similarly, Biller-Takahashi et al. (2012) did not observe modulatory effect of β -glucan (0.0%, 0.1% and 1.0%) on ACH₅₀ in pacu fed for 7 days. Using the same experimental protocol and same fish, Biller-Takahashi et al. (2014) found activation of the ACH₅₀ after experimental infection with *A. hydrophila* but not by effect of β -glucan.

Different from our study, other authors related increase in ACH₅₀ caused by β -glucan (Chang et al., 2013; Pionnier et al., 2014; Domenico et al., 2017; Lee et al., 2018). However, the lack of responsiveness could be related to a number of factors. Although we cannot state, some factors must be taken into account to explain the lack of β -glucan effect in our experiment. The β -glucan concentration or time of administration may have been insufficient to activate the receptors that trigger the mechanism of the complement system.

Regarding the molecules tested, it is remarkable the difference between the mean size of BG01 (35.20 μ m) and BG02 (23.40 μ m) (Supplementary Table 1). However, particles with size larger than 50 μ m present a difference of only 16.6% of BG01 in relation to BG02. Small particles (> 10 μ m and > 20 μ m) present the largest difference between molecules (33.9% and 41.8% respectively), thus increasing the mean, so in fact the percentage of larger particles between β -glucans is not so high. The size or molecular weight of β -glucans has been considered fundamental to their activity (Akramiene et al., 2007), however, particle size is not necessarily directly related to its activity, so generalization of this nature

is risky (Chen and Seviour, 2007). Hong et al. (2010) analyzed the degradation of fluorescence-labeled yeast glucan particles in mice macrophages and showed that macrophages were able to partially degrade the large molecules of β -glucan into biologically active smaller fragments that were taken up by granulocytes via the CR3 receptor. Complete macrophage degradation required 13 days. Typically ingested particles remained intact for 3 - 5 days, appeared to fragment into smaller particles and soluble material (5 - 10 days), and the intracellular fluorescence disappeared after 14 - 21 days.

Although we did not observe effects of both β -glucans molecules on stress indicators, they affected differently the innate immunity of pacu. Similarly, other studies have shown that different processes to obtain β -glucans may affect immune fish responses. Pilarski et al. (2017) observed that different β -glucans showed distinct effects on *Oreochromis niloticus*, one of the molecules affected the fish immune response and the other the growth performance. Similarly, Franco Montoya et al. (2018) tested two distinct molecules of β -glucan and showed that one of them was more efficient on the induction of the cell-mediated immunity in matrinxã (*Brycon amazonicus*).

Although most studies use these periods of β -glucan administration, there is no consensus on the optimal period. We should take into consideration that this period may vary depending on the structure of the β -glucan molecule, concentration, particle size, species of fish, among other factors. Our study indicates that β -glucan obtained from residual yeasts of the production of alcohol (BG02) is effective as immunostimulant and can be an alternative to reduce cost of fish production, besides to be aligned with the new demands of the market for the development of ecologically correct products. However further studies with different protocols using these molecules are needed to confirm their effectiveness.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Aquaculture Center of Unesp (CAUNESP) for the fish supply, the Biorigin for the β -glucans donation and intellectual support, and would also like to thank Joint Research Project Biobased Economy: São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant 2013/50418-1) and

Netherlands Organization for Scientific Research (NWO, number 729.004.002). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Appendix

Supplementary Table 1. Compositions of BG01 and BG02 included in the diets.

Parameters	BG01	BG02	Reference
pH (sol. 2%)	6.29	3.01	(1) AOAC 981.12
Moisture (%)	6.66	8.68	(1) AOAC 934.01
Protein (%)	5.99	13.60	(1) AOAC 990.03
Fat (%)	3.53	4.19	(1) AOAC 922.06
Ash (%)	2.40	0.50	(1) AOAC 942.05
Glucan (%)	69.00	56.40	(2)
Mannan (%)	1.10	5.60	(2)
Others carbohydrates (%)	11.32	11.03	(3)
Ca (%)	0.11	0.04	(4)
P (%)	0.15	0.24	
K (%)	0.16	0.04	
Na (%)	0.93	0.03	
Mg (%)	0.09	0.01	
Cu (mg/kg)	0.93	3.82	
Fe (mg/kg)	143.66	77.93	
Mn (mg/kg)	6.99	< 0.50	
Zn (mg/kg)	548.14	56.20	
Co (mg/kg)	< 0.50	< 0.50	
Mo (mg/kg)	< 0.50	< 0.50	
Ni (mg/kg)	0.62	< 0.50	
Pb (mg/kg)	< 0.50	< 0.50	
Cr (mg/kg)	2.20	< 0.50	
Ba (mg/kg)	3.90	1.22	
Al (mg/kg)	125.06	7.03	
Cd (mg/kg)	< 0.50	< 0.50	
S (%)	0.06	0.08	
Particle size – Mean (µm)	35.20	23.40	(5)
Particle size > 10 µm (%)	91.60	60.50	
Particle size > 20 µm (%)	72.10	41.90	
Particle size > 50 µm (%)	18.60	15.50	
Particle size > 100 µm (%)	3.80	00.00	
Particle size > 200 µm (%)	0.00	00.00	
Particle size > 500 µm (%)	0.00	00.00	
Particle size > 1000 µm (%)	0.00	00.00	
Particle size < 150 µm (%)	99.80	100.00	

[1] A.O.A.C, Official Methods of Analysis, 14a. Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1984.

[2] Freimund, S., Janett, S., Arrigoni, E., Amad, R., 2005. Optimised quantification method for yeast-derived 1,3-β-D-glucan and α-D-mannan. European Food Research and Technology 220, 101–105. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1008-0>

[3] Jeff Rohrer, Analysis of Carbohydrates by HighPerformance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD), Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA, Technical note 20, 2013.

[4] ISO 27085:2009, Animal Feeding stuffs – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, arsenic, lead and cadmium by ICP-AES.

[5] ISO 13320:2009. Particle size analysis – Laser diffraction methods.

5. References

- Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H., 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish Shellfish Immun. 22, 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.011>
- Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis, E., 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. Medicina (Kaunas) 43, 597–606.
- AOAC, 2016. Official Methods of analysis, eighteenth ed. Association of official analytical chemists, Arlington, VA, USA.
- Aramli, M.S., Kamangar, B., Nazari, R.M., 2015. Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Fish Shellfish Immun. 47, 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.004>
- Basso, L.C., Basso, T.O., Rocha, S.N., 2011. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation, in: Carlos, L., Olitta, T., Nitsche, S. (Eds.). Biofuel production-recent developments and prospects. InTech, Croatia, 85–100.
- Biller-Takahashi, J., Takahashi, L., Marzocchi-Machado, C., Zanuzzo, F., Urbinati, E., 2014. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan. Braz. J. Biol. 74, 698–703. <https://doi.org/10.1590/bjb.2014.0083>
- Biller-Takahashi, J., Takahashi, L., Saita, M., Gimbo, R., Urbinati, E., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Braz. J. Biol. 73, 425–429. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Marzocchi-Machado, C.M., Zanuzzo, F.S.,

Sabioni, R.E., Urbinati, E.C., 2012. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Rev. Bras. Zootecn. 41, 237–241. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000200001>

Błaszczak, K., Wilczak, J., Harasym, J., Gudej, S., Suchecka, D., Królikowski, T., Lange, E., Gromadzka-Ostrowska, J., 2015. Impact of low and high molecular weight oat beta-glucan on oxidative stress and antioxidant defense in spleen of rats with LPS induced enteritis. Food Hydrocolloid. 51, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.025>

Bozzo, F.R., Moraes, J.R.E., Ruas de Moraes, F., Pereira, G.T., Tavares-Dias, M., Onaka, E.M., 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response Induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characidae). J. World Aquacult. Soc. 38, 302–308. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00100.x>

Bridle, A.R., Carter, C.G., Morrison, R.N., Nowak, B.F., 2005. The effect of beta-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease - evidence of inherent resistance. J. Fish Dis. 28, 347–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00636.x>

Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. Fish Shellfish Immun. 54, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.011>

Chang, C.-S., Huang, S.-L., Chen, S., Chen, S.-N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture. Fish Shellfish Immun. 35, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.004>

Chen, J., Seviour, R., 2007. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-

glucans. Mycol. Res. 111, 635–652. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.02.011>

D.P. Anderson, A.K. Siwicki, 1995. Basic hematology and serology for fish health programs, in: D.P. Anderson, A.K. Siwicki (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture II. Asian Fisheries Society, pp. 185–202.

Dalmo, R.A., Bøgwald, J., 2008. β -glucans as conductors of immune symphonies. Fish Shellfish Immun. 25, 384–396. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.008>

Das, B., Pattnaik, P., Debnath, C., Swain, D., Pradhan, J., 2013. Effect of β -glucan on the immune response of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch) challenged with fungus *Saprolegnia parasitica*. SpringerPlus 2, 197. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-197>

Das, B.K., Debnath, C., Pattnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Misra, B.K., 2009. Effect of β -glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). Fish Shellfish Immun. 27, 678–683. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.002>

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuni, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Moss, A.S., Dossou, S., Wei, H., 2017. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. Aquacult. Nutr. 23, 148–159. <https://doi.org/10.1111/anu.12376>

De Oliva-Neto, P., Oliveira, S.S., Zilioli, E., Zilioli Bellini, M., 2016. Yeasts as potential source for prebiotic β -glucan: Role in human nutrition and health, in: Rao, V., Rao, L.G. (Eds.), Probiotics and prebiotics in human nutrition and health. InTech. <https://doi.org/10.5772/63647>

Del Rio-Zaragoza, O.B., Fajera-Vila, E.J., Almazán-Rueda, P., 2011. Influence of β -glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans: β -1,3/1,6-glucan influence on *Lutjanus guttatus*. Parasite Immunol. 33, 483–494. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

Demers, N.E., Bayne, C.J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 363–373.

Domenico, J.D., Canova, R., Soveral, L. de F., Nied, C.O., Costa, M.M., Frandoloso, R., Kreutz, L.C., 2017. Immunomodulatory effects of dietary β -glucan in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Pesqui. Vet. Bras.* 37, 73–78. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000100012>

Ebrahimi, G., Ouraji, H., Khalesi, M.K., Sudagar, M., Barari, A., Zarei Dangesaraki, M., Jani Khalili, K.H., 2012. Effects of a prebiotic, Immunogen[®], on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings: Effects of a prebiotic, Immunogen[®]. *J. Anim. Physiol. An. N.* 96, 591–599. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01182.x>

Franco Montoya, L.N., Favero, G.C., Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C., 2018. Distinct β -glucan molecules modulates differently the circulating cortisol levels and innate immune responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish Shellfish Immun.* 83, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.042>

Franco Montoya, L.N., Martins, T.P., Gimbo, R.Y., Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C., 2017. β -Glucan-induced cortisol levels improve the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish Shellfish Immun.* 60, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.055>

Gómez, G.D., Balcázar, J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish: Table 1. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 52, 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>

Gopalakannan, A., Arul, V., 2009. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast: Immune response of *Cyprinus carpio* to β -glucan. *Aquac. Res.*

41, 884–892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02368.x>

Guselle, N.J., Markham, R.J.F., Speare, D.J., 2007. Timing of intraperitoneal administration of beta-1,3/1,6 glucan to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), affects protection against the microsporidian *Loma salmonae*. J. Fish Dis. 30, 111–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00781.x>

Holland, M.C.H., Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. Fish Shellfish Immun. 12, 399–420. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0408>

Hong, F., Yan, J., Baran, J.T., Allendorf, D.J., Hansen, R.D., Ostroff, G.R., Xing, P.X., Cheung, N.-K.V., Ross, G.D., 2004. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. J. Immunol. 173, 797–806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.797>

Iwama, G.K., 1998. Stress in Fish. Ann. N.Y. Acad. Sci. 851, 304–310. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x>

Jung-Schroers, V., Adamek, M., Jung, A., Harris, S., Dóza, ö.-S., Baumer, A., Steinhagen, D., 2016. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). Aquacult. Nutr. 22, 1026–1039. <https://doi.org/10.1111/anu.12320>

Klebanoff, S.J., 1999. Oxygen metabolites from phagocytes, in: Gallin, J.I. and Snyderman, R. (Eds.), Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 721–768.

Kunttu, H.M.T., Valtonen, E.T., Suomalainen, L.-R., Vielma, J., Jokinen, I.E., 2009. The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immun. 26, 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.013>

Lapatra, S.E., Lauda, K.A., Jones, G.R., Shewmaker, W.S., Bayne, C.J., 1998.

Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased. *Fish Shellfish Immun.* 8, 435–446. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0151>

Lee, J.-H., Kim, J.-W., Kang, Y.-J., Ko, D.-W., Kim, J.-M., Choi, S.-H., Park, K.H., 2018. Effects of β -1,3-glucan on innate immunity responses and mortality induced by *Vibrio harveyi*, hemorrhagic septicemia virus, or *Miamiensis avidus* in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Int.* 26, 743–756. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0248-0>

Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, T.B.H., 2016. Dietary β -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. *Fish Shellfish Immun.* 48, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.013>

Orlean, P., 2012. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* 192, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>

Paredes, M., Gonzalez, K., Figueroa, J., Montiel-Eulefi, E., 2013. Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. *Fish. Physiol. Biochem.* 39, 1215–1221. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9777-7>

Paulsen, S.M., Engstad, R.E., Robertsen, B., 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immun.* 11, 23–37. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0291>

Petit, J., Wiegertjes, G.F., 2016. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.003>

Pilarski, F., Ferreira de Oliveira, C.A., Darpossolo de Souza, F.P.B., Zanuzzo, F.S., 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial

resistance in Nile tilapia. Fish Shellfish Immun. 70, 25–29.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.059>

Pionnier, N., Falco, A., Miest, J.J., Shrive, A.K., Hoole, D., 2014. Feeding common carp *Cyprinus carpio* with β -glucan supplemented diet stimulates C-reactive protein and complement immune acute phase responses following PAMPs injection. Fish Shellfish Immun. 39, 285–295.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.008>

Sang, H.M., Fotedar, R., 2010. Effects of mannan oligosaccharide dietary supplementation on performances of the tropical spiny lobsters juvenile (*Panulirus ornatus*, Fabricius 1798). Fish Shellfish Immun. 28, 483–489.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.011>

Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquac. Res. 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>

Sealey, W.M., Barrows, F.T., Johansen, K.A., Overturf, K., LaPatra, S.E., Hardy, R.W., 2007. Evaluation of the ability of partially autolyzed yeast and grobiotic-A to improve disease resistance in rainbow trout. N. Am. J. Aquacult. 69, 400–406.
<https://doi.org/10.1577/A06-080.1>

Sirimanapong, W., Adams, A., Ooi, E.L., Green, D.M., Nguyen, D.K., Browdy, C.L., Collet, B., Thompson, K.D., 2015a. The effects of feeding immunostimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. Fish Shellfish Immun. 45, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.025>

Sirimanapong, W., Thompson, K.D., Ooi, E.L., Bekaert, M., Collet, B., Taggart, J.B., Bron, J.E., Green, D.M., Shinn, A.P., Adams, A., Leaver, M.J., 2015b. The effects of feeding β -glucan to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to *Edwardsiella ictaluri*. Fish Shellfish Immun. 47, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.042>

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Ginés, R., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS): Effects of dose dietary administration of MOS. *Aquacult. Nutr.* 17, 223–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00730.x>

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M.S., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immun.* 23, 969–981. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.007>

Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M., 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish Shellfish Immun.* 36, 525–544. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.029>

Torrecillas, Silvia, Makol, A., Benítez-Santana, T., Caballero, M.J., Montero, D., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2011. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish Shellfish Immun.* 30, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.020>

Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F., 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura, in: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, pp.71–193.

van Zyl, W.H., den, R., la Grange, D.C., 2011. Developing organisms for consolidated bioprocessing of biomass to ethanol, in: Dos Santos Bernardes, M.A. (Ed.), *Biofuel production-recent developments and prospects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/18171>

Vetvicka, V., Thornton, B.P., Ross, G.D., 1996. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the

receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. J. Clin. Invest. 98, 50–61. <https://doi.org/10.1172/JCI118777>

Vetvicka, V., Vetvickova, J., 2014. Comparison of immunological effects of commercially available β -glucans. App. Sci. Report. 1, 2. <https://doi.org/10.7243/2054-9903-1-2>

Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by β -glucans. Physiol. Behav. 94, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.045>

Yoo, G., Lee, S., Kim, Y.C., Okorie, O.E., Park, G.J., Han, Y.O., Choi, S.-M., Kang, J.-C., Sun, M., Bai, S.C., 2007. Effects of dietary β -1,3 glucan and feed stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. World Aquacult. Soc. 38, 138–145. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00082.x>

Zanuzzo, F.S., Sabioni, R.E., Montoya, L.N.F., Favero, G., Urbinati, E.C., 2017. *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immun. 65, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.013>

Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C., Rise, M.L., Hall, J.R., Nash, G.W., Gamperl, A.K., 2015. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture 435, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.010>

MANUSCRITO III

Avaliação de β -glucanos residuais de fermentação alcoólica na microbiota intestinal de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando sequenciamento massivo (Illumina® sequencing)

Raphael Barbetta de Jesus ^a, Marianna Vaz Rodrigues ^b, Thiago Fernandes da Silva ^a e Fabiana Pilarski ^a

^a Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP - Univ Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

^b Instituto de Biociências, UNESP- Univ Estadual Paulista. R. Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 18618-689, Botucatu, SP, Brasil.

*autor correspondente: Fabiana Pilarski

Endereço de e-mail: fabiana.pilarski@unesp.br

Endereço atual: Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP - Univ Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brasil

Resumo

Poucos são os estudos que enfatizam a compreensão da microbiota intestinal em peixes. A diversidade de habitats e a variação da natureza das dietas faz com que a simbiose entre peixes e microrganismos intestinais seja diversa. Os processos fisiológicos dos animais, incluindo o metabolismo e seu sistema imunológico, são intensamente influenciados pela microbiota. Estudos recentes tem relatado que imunoestimulantes são capazes de modular a microbiota intestinal dos peixes. Dentre os imunoestimulantes mais utilizados e estudados na produção animal está o β -glucano, que possui estrutura química muito semelhante aos prebióticos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição intestinal bacteriana de pacus alimentados com dois diferentes β -glucanos residuais provenientes da fermentação alcoólica. Para avaliar a diversidade bacteriana intestinal, foram utilizados seis pacus por tratamento alimentados por 21 dias com 1 g kg^{-1} de β -glucano. Para a colheita do intestino, os peixes foram anestesiados, lavados em água corrente e pulverizados com álcool. Após a higienização, procedeu-se a necropsia e o intestino foi totalmente retirado. Os intestinos foram suspensos em tampão PBS contendo Tween 80, metanol e terc-butanol, acrescidos com 20 microesferas de vidro e vortexadas por 1 minuto. As suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes recuperados, transferidos para tubos estéreis, seguidos de nova centrifugação. O material precipitado foi utilizado para extração de DNA metagenômico. Em seguida, foi realizada a PCR (16S rRNA) e em sequência procedeu-se a construção da biblioteca e sequenciamento utilizando-se a plataforma Illumina MiSeq. Não foram observadas grandes diferenças entre os tratamentos nos principais gêneros bacterianos identificados. Observou-se grande prevalência em todos os tratamentos dos gêneros *Cetobacterium*, *Plesiomonas* e *Epulopiscium* os quais representam aproximadamente 60% de todos os gêneros identificados na microbiota intestinal do pacu. Os outros 40% distribuem-se em gêneros de menor expressão percentual.

Palavras chave: *Cetobacterium*, *Epulopiscium*, intestino, *Plesiomonas*, microbiota, 16S rRNA

1. Introdução

A maior parte dos estudos de comunidades microbianas intestinais de vertebrados tem se concentrado em mamíferos, os quais compreendem menos de 10% da diversidade total dos vertebrados. Poucos são os estudos que investigam a microbiota intestinal de peixes, que se originaram há mais de 600 milhões de anos e abrangem aproximadamente 28.000 espécies existentes (Nelson, 2016), o que representa quase metade do número total de espécies de vertebrados no mundo. A diversidade de habitats e a variação da natureza das dietas faz com que a simbiose entre peixes e microrganismos intestinais seja extremamente diversa. Quantificar, qualificar e desvendar como se dão essas relações são de profunda importância para o desenvolvimento de dietas mais específicas para cada espécie de peixe.

Os processos fisiológicos dos animais, incluindo o metabolismo e seu estado imunológico e até mesmo a anatomia do intestino, são profundamente influenciados pela microbiota intestinal (Rawls et al., 2004; Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010). As bactérias, componentes desta microbiota são geralmente benéficas e contribuem para processos nutricionais importantes, como na degradação de moléculas complexas, produção de algumas vitaminas (Sugita et al., 1991) e também estão envolvidas na proteção do hospedeiro contra potenciais patógenos, pela produção de compostos inibitórios e competição por espaço e nutrientes (Rawls et al., 2004). Rawls et al. (2004), utilizando *Danio rerio* genobióticos, demonstraram que a microbiota pode regular a expressão de 212 genes, nos quais alguns estavam relacionados à estimulação da proliferação epitelial, promoção do metabolismo de nutrientes e resposta imune inata. Em decorrência destes fatos, estudos da comunidade microbiana gastrointestinal vêm sendo realizados com várias espécies de peixes, como *Salmo salar* (Zarkasi et al. 2014), *Cyprinus carpio* (Jung-Schroers et al., 2016); *Acipenser baerii* (Geraylou et al., 2013); *Peocilia reticulata* (Sullam et al., 2015); *Salmo trutta trutta* (Skrodenyte-Arbaciauskiene et al., 2008); *Salmo trutta fario* (Skrodenyte-Arbaciauskiene et al., 2006); *Oreochromis niloticus* (Hu et al., 2007); *Danio rerio* (Russo et al., 2015), entre outros.

Estudos recentes tem relatado que imunoestimulantes são capazes de modular a microbiota intestinal dos peixes (Kühlwein et al., 2013; Carda-Diéguez,

Mira e Fouz, 2014; Jung-Schroers et al., 2016). A inclusão de imunostimulantes na dieta de peixes é uma das principais estratégias para alcançar uma aquicultura sustentável. Estas dietas enriquecidas são administradas durante períodos curtos, quando o risco de contrair infecções por animais aquáticos é maior (Miguel Carda-Diéguéz, Alex Mira e Bélen Fouz, 2014).

Dentre os imunostimulantes mais utilizados e estudados encontra-se o β -glucano. A estrutura química do β -glucano é muito semelhante aos prebióticos, consistindo em unidades monoméricas ligadas a β -glicosídicas. Os prebióticos, definidos como ingredientes alimentares não digeríveis, afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias intestinais associadas à saúde e ao bem-estar (Gibson et al., 2004).

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando o β -glucano como um potente imunostimulante. Estes estudos tem demonstrado que uso do β -glucano atua positivamente em diversas variáveis, como crescimento (Kühlwein et al., 2014; Pilarski et al., 2017), sobrevivência e resistência à patógenos (Das et al., 2009; Sang e Fotedar, 2010; Petit e Wiegertjes, 2016), produção de anticorpos (Kamilya et al. 2006), expressão dos genes relacionados ao sistema imune inato (Lokesh et al., 2012; Pietretti et al., 2013) e alteração da microbiota intestinal (Kühlwein et al., 2013; Jung-Schroers et al., 2016; Miest et al., 2016) em várias espécies de peixes.

Porém, o custo de produção do β -glucano ainda é um fator limitante para a ampla disseminação e aproveitamento dos benefícios do uso deste imunostimulante. Criar fontes alternativas mais acessíveis para este tipo de tecnologia é desejável para o desenvolvimento de uma piscicultura mais competitiva.

Neste contexto, o Centro de pesquisa da Biorigin desenvolveu um produto, ainda não comercial, baseado na produção de 1,3/1,6 β -glucano extraído de leveduras residuais (*Saccharomyces cerevisiae*) provenientes de fermentação alcoólica. A utilização de leveduras residuais, além de possibilitar a redução do custo de produção, está alinhada às novas demandas do mercado para o desenvolvimento de produtos ecologicamente corretos, uma vez que utiliza material residual.

Assim, este estudo teve como objetivo alimentar durante 21 dias pacus com dietas contendo dois tipos de β -glucanos com diferentes níveis de purificação

e processos de extração, desenvolvidos pelo Centro de pesquisa da Biorigin e avaliar a diversidade bacteriana intestinal pelo sequenciamento do gene 16S rRNA através da plataforma Illumina MiSeq, a fim de observar possíveis efeitos modulatórios dos β -glucanos sobre a microbiota intestinal.

2. Material e métodos

O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP (número do protocolo 11336/15).

2.1. Animais experimentais

Foram utilizados 162 pacus ($163,0 \pm 23,07$ g, $16,0 \pm 0,77$ cm) distribuídos em nove tanques (450 L, 18 peixes por tanque) com aeração e fluxo contínuo de água. Durante o período experimental, a temperatura da água ($30,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), pH ($7,5 \pm 0,06$), oxigênio dissolvido ($6,06 \pm 0,90$ mg L⁻¹), condutividade ($0,180 \pm 0,00$ mS cm⁻¹), sólidos totais ($0,117 \pm 0,0$ g L⁻¹) e salinidade ($0,01 \pm 0,0\%$) foram monitorados. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre peso e comprimento dos peixes e parâmetros da água entre os nove tanques.

2.2. Delineamento e dieta experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições (tanques). Após 20 dias de aclimação, os peixes foram alimentados com três dietas experimentais por 21 dias: uma dieta controle (sem β -glucano) e duas dietas com 1 g kg⁻¹ (0,1%) de dois diferentes β -glucanos.

Dois β -glucanos isolados a partir de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) da indústria produtora de álcool foram utilizados neste experimento: BG01 (pureza = 69%, número de lote = Q515244) e BG02 (pureza = 56,4%, número de lote = BT13_260), ainda não comercialmente, ambos desenvolvidos pela Biorigin (SP, Brasil). Três dietas foram formuladas, duas com β -glucanos e uma dieta controle sem β -glucano. As proporções dos ingredientes e a análise química das dietas são apresentadas na Tabela 1. Informações adicionais sobre as amostras de β -

glucanos estão na Tabela suplementar 1 (apêndice). As dietas foram extrudadas em extrusora de rosca simples (Mex-250, Manzoni Indústria Ltda, Brasil) à 136°C e a velocidade de extrusão regulada para tamanho de pellets de $6,71 \pm 0,24$ mm de diâmetro e $7,76 \pm 0,37$ mm de comprimento. As dietas foram analisadas quanto à sua composição química, de acordo com AOAC (2016). O nitrogênio foi determinado em analisador de nitrogênio (LECO FP-528 - LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). A alimentação foi parcelada em duas vezes ao dia (9h00 e 17h00), totalizando 3,0% do peso vivo.

Tabela 1. Ingredientes e composição química dos nutrientes das dietas experimentais.

	Controle	BG 01	BG 02
Ingredientes (g/kg MS)			
Farinha de peixe	42,6	42,6	42,6
Farinha de vísceras de aves	74,6	74,6	74,6
Farelo de soja	312,0	312,0	312,0
Milho	283,1	283,1	283,1
Farelo de trigo	190,0	190,0	190,0
Quirera de arroz	50,0	50,0	50,0
Óleo de soja	13,0	13,0	13,0
BHT (antioxidante)	0,2	0,2	0,2
Fosfato bicálcio	10,0	10,0	10,0
Calcário calcítico	10,2	10,2	10,2
Suplemento mineral e vitamínico ^a	1,9	1,9	1,9
Cloreto de colina	1,3	1,3	1,3
Caulim	11,1	10,1	10,1
β-glucano	0,0	1,0	1,0
Composição química			
Matéria seca [g/kg MS]	938,9	947,9	941,4
Proteína bruta [g/kg MS]	286,6	278,7	277,1
Extrato etéreo [g/kg MS]	31,1	30,0	33,1
Fibra bruta [g/kg MS]	78,6	87,1	82,6
Matéria mineral [g/kg MS]	91,0	102,4	99,6
Extrato não nitrogenado [g/kg MS]	451,7	449,8	449,0
Energia [MJ/kg MS]	17,3	17,2	17,2

^a Suplemento mineral e vitamínico (composição por kg) - Vit. A: 176.000 UI, vit. D3: 40.000 UI, vit E: 500 mg, vit. K3: 100 mg, vit. B1: 36 mg, vit. B2: 200 mg, vit. B6: 50 mg, vit. B12: 560 mg, B3:

700 mg, B7: 3 mg, B5: 500 mg, B9: 30 mg, colina: 20 mg, Fe: 1.100 mg, Cu: 300 mg, Mn: 1.800 mg, Zn: 1.200 mg, I: 24 mg, metionina: 20 g, Se: 3 mg, Ca: 176 g, P: 68 g; Na: 23 g, Cl: 36 g.

2.3. *Amostragem*

Para colheita do intestino, foram utilizados seis peixes de cada tratamento, submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). Os peixes foram lavados em água corrente e em sequência pulverizados com álcool (70%). Após a higienização, foi procedida a necropsia de forma asséptica em fluxo laminar e o intestino foi totalmente retirado e armazenado sob refrigeração (-80°C).

2.4. *Preparo das amostras e extração do DNA total*

Para a extração do DNA total, foi realizado processamento prévio do material colhido de acordo com Tran et al. (2017), com pequenas modificações. Em resumo, o intestino refrigerado foi suspenso em 40 mL de solução tampão (pH 7,0) contendo (v/v) 0,1% de Tween 80, 1,0% de metanol e 1,0% de terc-butanol, acrescidos com 20 microesferas de vidro e depois submetido ao vortex durante 1 minuto. A suspensão foi centrifugada a $500 \times g$ durante 30 segundos à 20°C . Os sobrenadantes foram então recuperados e transferidos para tubos estéreis, seguidos por centrifugação a $4.500 \times g$ durante 30 minutos a 20°C . O material precipitado, que representa a biomassa microbiana, foi colhido e utilizado para extração de DNA.

A extração do DNA total foi realizada utilizando 200 μL da biomassa microbiana com o Kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e quantidade do DNA foi verificada em gel de agarose 2,0%, complementarmente o DNA foi avaliado por espectrofotometria (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para avaliação de sua qualidade (razão entre as leituras das absorvâncias 260/280 e 260/230 nm) e quantidade.

2.5. *PCR*

A região V4 do gene 16S rRNA das 18 amostras foram amplificados por PCR (Caporaso et al., 2011), gerando amplicons com aproximadamente 300 pb.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata de amostras, tendo como volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 0,3 µM de oligonucleotídeo *forward* e 0,3 µM de oligonucleotídeo *reverse*, 1 µL de DNA e água ultrapura estéril suficiente para 20 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

2.6. Construção da biblioteca e sequenciamento

As triplicatas de PCR de cada amostra foram reunidas em uma alíquota e submetida às etapas de purificação utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA), e quantificadas pela metodologia PCR Tempo Real utilizando Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acordo com o protocolo do fabricante.

Gerou-se um *pool* equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 4 nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing, San Diego, Califórnia, EUA).

2.7. Processamento e análise de dados

A qualidade das sequências foram verificadas utilizando o Trimmomatic (v0.32) (Bolger, Lohse e Usadel, 2014). Posteriormente, as sequências foram formatadas com o pipeline UPARSE e verificadas com relação às sequências quiméricas (Edgar, 2013). O pipeline USEARCH7 foi utilizado para agrupar as sequências em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com 97% de similaridade. A taxonomia foi atribuída usando o RDP, implementado no QIIME, (McIlroy et al., 2015) como banco de dados de referência.

3. Resultados

O método de preparo das amostras e extração do DNA metagenômico do conteúdo intestinal dos pacus foi satisfatório, pois apresentou DNAs com razões entre as leituras das absorbâncias 260/280 nm ($1,98 \pm 0,03$) e 260/230 nm ($2,39 \pm 0,04$) e quantidade ($196,03 \pm 91,48$ ng/ μ L). O DNA obtido apresentou degradação, com fragmentos de tamanho molecular médio de aproximadamente 750 – 1.000 pb, apresentando poucos fragmentos entre 8.000 – 10.000 pb (Figura 1.). As amostras de DNAs metagenômicos utilizados na PCR apresentaram amplicons com aproximadamente 300 pb, como esperado para região amplificada.

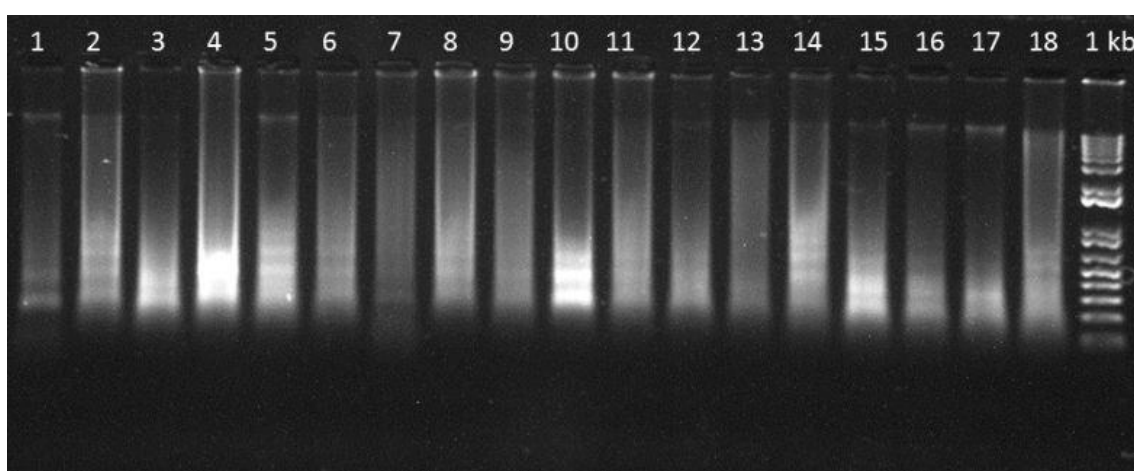


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2,0% do DNA metagenômico. 1 – 18 DNA metagenômico do conteúdo intestinal dos pacus; 19 - Marcador - 1 kb.

Após o sequenciamento, foram obtidas aproximadamente 45.000 sequências com qualidade do fragmento amplificado. A diversidade bacteriana intestinal foi estimada através da curva de rarefação. A análise de rarefação foi realizada plotando o número de Unidades Taxonômicas Operacionais UTOs agrupados em 97% de similaridade em relação ao número de *reads* para o nível taxonômico de gênero (Figura 2).

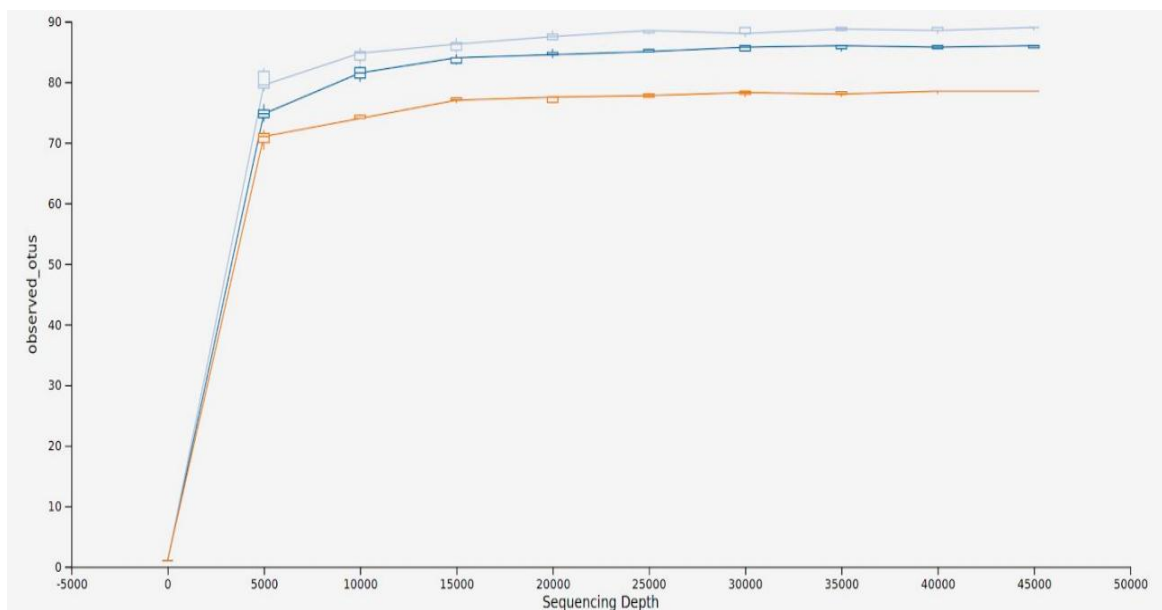


Figura 2. Curva de rarefação indicando o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com distâncias evolutivas de 3%, com base nas leituras obtidas pelo sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA. A curva laranja representa o grupo controle, a curva azul escuro o grupo BG01 e curva azul claro o grupo BG02.

A classificação taxonômica até o nível de gêneros bacterianos presentes no conteúdo intestinal dos pacus foi atribuída através do Ribosomal Database Project (RDP) e pode ser observada na Tabela 2. Foram identificados apenas cinco filos em todos os tratamentos sendo, Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria e Bacteroidetes.

Tabela 2. Afiliações taxonômicas de filo até gênero do tratamento controle (C), BG01 e BG02.

Classificação taxonômica	C (%)	BG01 (%)	BG02 (%)
Bacteroidetes, Bacteroidia, Bacteroidales, Bacteroidaceae, g__	12,42	2,50	2,17
Bacteroidetes, Bacteroidia, Bacteroidales, Bacteroidaceae, <i>Bacteroides</i>	2,75	4,24	2,45
Bacteroidetes, Bacteroidia, Bacteroidales, RF16, g__	0,02	0,00	0,00
Bacteroidetes, Bacteroidia, Bacteroidales, Rikenellaceae, g__	0,07	0,40	0,18
Firmicutes, Bacilli, Turicibacterales, Turicibacteraceae, <i>Turicibacter</i>	1,03	1,69	1,18
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, f__, g__	0,43	0,83	1,22
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Christensenellaceae, g__	0,17	0,03	0,00
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Clostridiaceae, g__	16,85	21,14	12,73
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Clostridiaceae, <i>Clostridium</i>	0,22	0,49	0,17
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Clostridiaceae, <i>SMB53</i>	0,02	0,00	0,00
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Lachnospiraceae, g__	0,40	0,96	0,22
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Lachnospiraceae, <i>Coproccoccus</i>	0,08	0,93	1,02
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Lachnospiraceae, <i>Epulopiscium</i>	13,25	15,06	15,55
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Peptostreptococcaceae, g__	1,37	1,49	0,82
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Peptostreptococcaceae, g__	0,12	0,23	0,13
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Ruminococcaceae, g__	0,12	0,09	0,47
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Ruminococcaceae, <i>Oscillospira</i>	0,05	0,10	0,18
Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Mogibacteriaceae, <i>Anaerovorax</i>	0,03	0,00	0,00
Firmicutes, Erysipelotrichi, Erysipelotrichales, Erysipelotrichaceae, g__	0,12	0,01	0,02
Fusobacteria, Fusobacteriia, Fusobacteriales, Fusobacteriaceae, <i>Cetobacterium</i>	23,47	24,50	27,25
Fusobacteria, Fusobacteriia, Fusobacteriales, Fusobacteriaceae, <i>Fusobacterium</i>	1,47	1,24	1,73
Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Alcaligenaceae, g__	0,03	0,01	0,02
Proteobacteria, Betaproteobacteria, Neisseriales, Neisseriaceae, g__	0,03	0,01	0,00
Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Desulfovibrionales, Desulfovibrionaceae, <i>Desulfovibrio</i>	0,02	0,70	0,18
Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacteriales, Campylobacteraceae, g__	4,40	2,29	11,80
Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacteriales, Helicobacteraceae, g__	0,15	0,21	0,52
Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Aeromonadales, Aeromonadaceae, g__	0,03	0,14	0,02
Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, g__	0,07	0,11	0,07
Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, g__	1,82	0,97	0,85
Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, <i>Plesiomonas</i>	18,93	19,54	18,98

4. Discussão

Compreender a influência do β -1,3/1,6 glucano na comunidade bacteriana intestinal de peixes é de extrema importância, já que muitas destas bactérias possuem funções fisiológicas importantes, como na produção de vitaminas, ciclo do nitrogênio e fermentação de carboidratos. Neste estudo avaliamos duas fontes β -glucanos (BG01 e BG02) e sua possível influência na estrutura da comunidade bacteriana intestinal de pacus.

O método de preparo e extração das amostras de DNA foram satisfatórios para o tipo de análise deste trabalho, apesar da degradação observada nos DNAs extraídos, foi possível a amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de todas as 18 amostras.

Este se trata do primeiro trabalho avaliando a comunidade bacteriana intestinal de *Piaractus mesopotamicus* por sequenciamento de nova geração no mundo. Observamos em nosso trabalho, através do tratamento controle, a composição da microbiota intestinal e obtivemos como filos mais predominantes Firmicutes (34,23%), Proteobacteria (25,55%), Fusobacteria (24,92%) e Bacteroidetes (15,23%). Estes dados nos trazem informações primárias e primordiais para o entendimento da composição bacteriana deste microbioma, e abre uma nova e ampla área de pesquisa a ser investigada.

Jung-Schroers et al., (2016) estudando carpas (*Cyprinus carpio*) alimentadas com uma dose de 10 g kg⁻¹ de MacroGard® durante 14 dias avaliaram a diversidade de segmentos separados da microbiota intestinal através do isolamento e sequenciamento do gene 16S rRNA e pelo método RT-PCR-DGGE e detectaram um aumento significativo no número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) em todos os seguimentos do intestino dos peixes alimentados com MacroGard® quando comparados ao controle. Encontramos resultados similares em nosso trabalho, pois observamos maior número de UTOs nos tratamentos BG02 (88), BG01 (84) e controle (76) respectivamente. Podemos afirmar com estes resultados que a utilização de β -glucano em dietas para pacus eleva o número de UTOs, especialmente o BG02.

Ao observarmos a constituição do BG02 podemos verificar uma concentração de cinco vezes mais mananas que o BG01 (Tabela suplementar 1.). O MOS possui efeito prebiótico e seu principal modo de ação é na modulação da

microbiota intestinal, promovendo o crescimento de bactérias ácido lácticas, diminuindo a colonização por bactérias patogênicas através da competição por nutrientes e sítios de adesão (Andrews et al. 2009). Diversos trabalhos têm mostrado o efeito do MOS sobre a morfologia (Dimitroglou et al., 2009; Salem et al., 2016; Hisano et al., 2018) e microbiota intestinal de peixes (Dimitroglou et al., 2009; Dimitroglou et al., 2010; Akter et al., 2016).

Nossos resultados mostram claramente uma elevada porcentagem de bactérias pertencentes ao gênero *Cetobacterium* em todos os grupos avaliados (C: 23,47%; B01: 24,50%; B02: 27,50%), com discreta elevação deste grupo nos tratamentos B01 e B02 em relação ao controle. Este gênero bacteriano tem sido encontrado em elevadas quantidades em diversas espécies de peixes de água doce como *Arapaima gigas* (~70,50%; Ramírez et al., 2018), *Lepomis macrochirus* (72,04%; Larsen et al., 2014), *Micropterus salmoides* (89,90%; Larsen et al., 2014), *Ictalurus punctatus* (94,02%; Larsen et al., 2014), *Oncorhynchus mykiss* (~70,50%; Gatesoupe et al., 2017), *Ctenopharyngodon idella* (~64,51%; Li et al., 2015), *Carassius carassius* (~97,29%; Li et al., 2015), *Hypophthalmichthys nobilis* (~41,16%; Li et al., 2015), *Oreochromis niloticus* (~89,15%; Adeoye et al., 2016) entre outros. Vários trabalhos têm isolado e identificado bactérias deste gênero no intestino de peixes de água doce, em especial a espécie *Cetobacterium somerae* (anteriormente classificada como *Bacteroides* tipo A), microaerotolerante (Romero et al., 2014), que apresenta função importante na produção de vitamina B₁₂ no intestino de peixes (Sugita et al., 1991; Tsuchiya et al., 2007). Esta espécie é amplamente encontrada no intestino da tilápia do Nilo e carpas, por isso estas espécies não possuem exigência de vitamina B₁₂ na dieta (NCR, 2011), sendo totalmente supridas na produção desta vitamina por estas bactérias. Em pacu, trabalhos avaliando a exigência desta vitamina são inexistentes, sendo necessários estudos para verificar a real necessidade de suplementação na dieta, dada a quantidade de bactérias produtoras de vitamina B₁₂ encontradas nesta espécie em nosso estudo. Adicionalmente, a *Cetobacterium somerae* demonstrou capacidade de inibir o crescimento de outras de bactérias (Sugita et al., 1996), outra característica interessante, é que possui resistência ao antimicrobiano vancomicina, mesmo em cepas em que o hospedeiro não teve contato com a molécula (Tsuchiya et al., 2007).

Observamos uma grande porcentagem de bactérias pertencentes ao gênero *Plesiomonas* (C: 18,93%; B01: 19,54%; B02: 18,98%), com pouca diferença de porcentagens entre os tratamentos. O gênero *Plesiomonas* consiste apenas de uma espécie (*Plesiomonas shigelloides*) e está associada à água e alimentos de origem aquática. A bactéria é patogênica tanto para humanos quanto para animais, causando infecções extraintestinais e doenças gastrointestinais (Santos et al., 2015). *Plesiomonas* foram isoladas de uma ampla variedade de animais saudáveis, doentes ou em condições de necrópsia, ainda que existam poucas evidências patológicas, microbiológicas ou clínicas para apoiar o status de infecção nessas espécies (Janda et al., 2016), tendo registros de cepas resistentes a alguns antimicrobianos utilizados na aquicultura (Wamala et al., 2018; Martins et al., 2019). No entanto, nenhum caso de enfermidade ou mortalidade por infecção com a bactéria foi relatada em pacu na literatura. Estudos em várias espécies de peixes de água doce sugerem que o gênero *Plesiomonas* é uma das espécies mais comuns que compõem a comunidade bacteriana intestinal desses vertebrados (Janda et al., 2016), sendo encontradas tanto em peixes cultivados quanto em animais de vida livre (Koburger, 1989). Foram observados em porcentagens significativas em peixes como *Lepomis macrochirus* (2,84%; Larsen et al., 2014), *Micropterus salmoides* (7,64%; Larsen et al., 2014), *Oreochromis niloticus* (~5,32%; Adeoye et al., 2016), *Ictalurus punctatus* (~21,49; Bledsoe et al., 2016) sem que estes apresentassem algum sinal clínico de doença causada pela bactéria. Entretanto, casos de mortalidade envolvendo esta bactéria vêm sendo observados em algumas espécies como *Ctenopharyngodon idella* (Hu et al., 2014), *Oreochromis niloticus* (Liu et al., 2015) e *Hypophthalmichthys molitrix* (Behera et al., 2018). Tendo em vista sua distribuição em diversas espécies de peixes e sua porcentagem, pode ser que esta espécie esteja envolvida em alguma via metabólica importante no seu hospedeiro ainda não elucidada.

O gênero *Epulopiscium* foi observado em todos os tratamentos com uma porcentagem expressiva (C: 13,25%; B01: 15,06%; B02: 15,55%), tendo variado pouco entre os tratamentos. Este grupo bacteriano foi inicialmente identificado como pertencente aos protistas devido ao seu tamanho celular extremamente grande (até ~600 µm; Fishelson et al., 1985). São encontradas em alta porcentagem no trato intestinal de peixes herbívoros do grupo dos peixes-

cirurgiões (família: Acanthuridae). Apesar de seu tamanho peculiarmente grande, poliploidia (alguns com mais de 100.000 cópias de genoma por célula) e viviparidade, detalhes sobre sua diversidade, distribuição ou seu papel no hospedeiro ainda são pouco conhecidos. Estudos anteriores destacaram a existência de pelo menos 10 morfotipos distintos de *Epulopiscium* (Miyake et al., 2016) e estão intimamente associadas ao metabolismo de carboidratos (Ngugi et al., 2017). Em peixes de água doce quase não se há relatos da presença deste grupo. Larsen et al. (2014) observaram em baixas porcentagens no conteúdo intestinal de peixes de água doce como *Lepomis macrochirus* (0,01%), *Micropterus salmoides* (0,08%), *Ictalurus punctatus* (0,02%) bactérias do gênero *Epulopiscium*. Não há relatos da presença deste gênero em pacus, dado à elevada porcentagem deste grupo observado em todos os nossos tratamentos e a especificidade em relação ao hospedeiro, é de extrema importância aprofundar estudos relativos a este grupo, identificar as espécies presentes, seu papel metabólico e interação com outros microrganismos na microbiota intestinal de pacus.

Os três principais gêneros observados representam aproximadamente 60% de todos os gêneros identificados no intestino de pacus. Outros gêneros não classificados, pertencentes às famílias como Clostridiaceae (C: 16,85%; B01: 21,14%; B02: 12,73%) e Bacteroidaceae (C: 12,42%; B01: 2,50%; B02: 2,17%) foram identificados com abundância significativa nos tratamentos avaliados. Ainda podemos observar gêneros com porcentagens bem inferiores, porém, seu potencial metabólico não pode ser avaliado apenas em detrimento da quantidade desses microrganismos, mas também pelo seu potencial metabólico.

Diversos fatores podem afetar a avaliação da composição da comunidade bacteriana intestinal, desde a fração coletada (bactérias associadas à mucosa intestinal ou bactérias associadas à digesta, bactérias alóctone e autóctone, respectivamente) (Merrifield et al., 2009); fatores ambientais (Sullam et al., 2012), porção do intestino avaliada (Ye et al., 2014); dieta (Ringø et al., 2016); variação interindividual (Stephens et al., 2016); espécie de peixe (Wong et al., 2012); sexo do peixe (Li et al., 2016); modo de preparo das amostras (Tran et al., 2017) e extração do DNA (Larsen, Mohammed e Arias, 2014), primers e tecnologia de sequenciamento utilizada (Tremblay et al., 2015); banco de dados utilizados (Balvočiūtė e Huson, 2017); entre inúmeros outros fatores que podem influenciar

no resultado final da análise. Em experimentos desta natureza deve-se tomar o máximo de cuidado para que os procedimentos sejam o mais padronizados possíveis, evitando assim resultados inconsistentes.

Podemos observar a partir deste estudo uma pequena elevação na diversidade bacteriana intestinal dos peixes tratados com BG02 em relação ao BG01 e controle e que os gêneros predominantes foram *Cetobacterium*, *Plesiomonas* e *Epulopiscium* os quais representam aproximadamente 60% de todos os gêneros identificados na microbiota intestinal. Ressaltamos ainda a importância deste estudo, pois se trata da primeira investigação da microbiota bacteriana intestinal de peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* utilizando sequenciamento massivo, contribuindo para o conhecimento básico e abrindo novos horizontes para pesquisas nesta espécie.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Biorigin pela doação de β -glucanos e apoio intelectual, e também gostariam de agradecer ao Projeto Conjunto de Pesquisa Biobased Economy: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, processo 2013/50418-1) e Netherlands Organization for Scientific Research (NWO, número 729.004.002). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Material suplementar

Tabela suplementar 1. Composição do BG01 e BG02 incluídos na dieta.

Parâmetros	BG01	BG02	Referências
pH (sol. 2%)	6,29	3,01	(1) AOAC 981.12
Umidade (%)	6,66	8,68	(1) AOAC 934.01
Proteína (%)	5,99	13,60	(1) AOAC 990.03
Gordura (%)	3,53	4,19	(1) AOAC 922.06
Cinzas (%)	2,40	0,50	(1) AOAC 942.05
Glucano (%)	69,00	56,40	(2)
Manana (%)	1,10	5,60	(2)
Outros carboidratos (%)	11.32	11.03	(3)
Ca (%)	0,11	0,04	(4)
P (%)	0,15	0,24	
K (%)	0,16	0,04	
Na (%)	0,93	0,03	
Mg (%)	0,09	0,01	
Cu (mg/kg)	0,93	3,82	
Fe (mg/kg)	143,66	77,93	
Mn (mg/kg)	6,99	< 0,50	
Zn (mg/kg)	548,14	56,20	
Co (mg/kg)	< 0,50	< 0,50	
Mo (mg/kg)	< 0,50	< 0,50	
Ni (mg/kg)	0,62	< 0,50	
Pb (mg/kg)	< 0,50	< 0,50	
Cr (mg/kg)	2,20	< 0,50	
Ba (mg/kg)	3,90	1,22	
Al (mg/kg)	125,06	7,03	
Cd (mg/kg)	< 0,50	< 0,50	
S (%)	0,06	0,08	
Tamanho de partícula – Média (µm)	35,20	23,40	(5)
Tamanho de partícula > 10 µm (%)	91,60	60,50	
Tamanho de partícula > 20 µm (%)	72,10	41,90	
Tamanho de partícula > 50 µm (%)	18,60	15,50	
Tamanho de partícula > 100 µm (%)	3,80	00,00	
Tamanho de partícula > 200 µm (%)	0,00	00,00	
Tamanho de partícula > 500 µm (%)	0,00	00,00	
Tamanho de partícula > 1000 µm (%)	0,00	00,00	
Tamanho de partícula < 150 µm (%)	99.80	100.00	

[1] A.O.A.C, Official Methods of Analysis, 14a. Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1984.

[2] Freimund, S., Janett, S., Arrigoni, E., Amad, R., 2005. Optimised quantification method for yeast-derived 1,3-β-D-glucan and α-D-mannan. European Food Research and Technology 220, 101–105. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1008-0>

[3] Jeff Rohrer, Analysis of Carbohydrates by HighPerformance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD), Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA, Technical note 20, 2013.

[4] ISO 27085:2009, Animal Feeding stuffs – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, arsenic, lead and cadmium by ICP-AES.

[5] ISO 13320:2009. Particle size analysis – Laser diffraction methods.

5. Referências

A unique symbiosis in the gut of tropical herbivorous surgeonfish (Acanthuridae: Teleostei) from the Red Sea, 1985. . Science 229, 49–51. <https://doi.org/10.1126/science.229.4708.49>

Adeoye, A.A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. Aquaculture 463, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.028>

Akter, M.N., Sutriana, A., Talpur, A.D., Hashim, R., 2016. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. Aquaculture International 24, 127–144. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9913-8>

Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S., 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella: Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture Research 41, 61–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02304.x>

AOAC, 2016. Official Methods of analysis, eighteenth ed. Association of official analytical chemists, Arlington, VA, USA.

Balvočiūtė, M., Huson, D.H., 2017. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? BMC Genomics 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>

Bledsoe, J.W., Peterson, B.C., Swanson, K.S., Small, B.C., 2016. Ontogenetic characterization of the intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals Insights on temporal shifts and the influence of environmental microbes. PLOS ONE 11, e0166379.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166379>

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>

Carda-Diéguez, M., Mira, A., Fouz, B., 2014. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology* 87, 451–459. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12236>

Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology* 10, 735–744. <https://doi.org/10.1038/nri2850>

Das, B.K., Debnath, C., Patnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Misrhra, B.K., 2009. Effect of β -glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish & Shellfish Immunology* 27, 678–683. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.002>

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J., Bradley, G., 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal Science* 87, 3226–3234. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1428>

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth

performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 300, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.015>

Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nature Methods 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>

Gatesoupe, F.-J., Fauconneau, B., Deborde, C., Madji Hounoum, B., Jacob, D., Moing, A., Corraze, G., Médale, F., 2018. Intestinal microbiota in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets with different levels of fish-based and plant ingredients: A correlative approach with some plasma metabolites. Aquaculture Nutrition 24, 1563–1576. <https://doi.org/10.1111/anu.12793>

Geraylou, Z., Souffreau, C., Rurangwa, E., Maes, G.E., Spanier, K.I., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Buyse, J., Ollevier, F., 2013. Prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) with emphasis on the modulation of the gut microbiota using 454 pyrosequencing. FEMS Microbiology Ecology 86, 357–371. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12169>

Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews 17, 259. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>

Hisano, H., Soares, M.P., Luiggi, F.G., Arena, A.C., 2018. Dietary β -glucans and mannanoligosaccharides improve growth performance and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Aquaculture International 26, 213–223. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0210-6>

Hu, C.H., Xu, Y., Xia, M.S., Xiong, L., Xu, Z.R., 2007. Effects of Cu²⁺-exchanged montmorillonite on growth performance, microbial ecology and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 270, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.027>

Hu, Q., Lin, Q., Shi, C., Fu, X., Li, N., Liu, L., Wu, S., 2014. Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 54, 229–235.

Janda, J.M., Abbott, S.L., McIver, C.J., 2016. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 29, 349–374. <https://doi.org/10.1128/CMR.00103-15>

Jung-Schroers, V., Adamek, M., Jung, A., Harris, S., Dóza, Ö.-S., Baumer, A., Steinhagen, D., 2016. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition* 22, 1026–1039. <https://doi.org/10.1111/anu.12320>

Kamilya, D., Maiti, T.K., Joardar, S.N., Mal, B.C., 2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of Fish Diseases* 29, 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00722.x>

Koburger, J. A. 1989. *Plesiomonas shigelloides*, p. 311–325. In M.P. Doyle (ed.), *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York.

Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D., Davies, S.J., 2014. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 279–289. <https://doi.org/10.1111/jpn.12078>

Larsen, A.M., Mohammed, H.H., Arias, C.R., 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm water fish species. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1396–1404. <https://doi.org/10.1111/jam.12475>

Larsen, A.M., Mohammed, H.H., Arias, C.R., 2015. Comparison of DNA extraction protocols for the analysis of gut microbiota in fishes. *FEMS Microbiology Letters* 362. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu031>

Li, T., Long, M., Gatesoupe, F.-J., Zhang, Q., Li, A., Gong, X., 2015. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microbial Ecology* 69, 25–36. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0480-8>

Li, X., Yan, Q., Ringø, E., Wu, X., He, Y., Yang, D., 2016. The influence of weight and gender on intestinal bacterial community of wild largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*, 1874). *BMC Microbiology* 16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0809-1>

Liu, Z., Ke, X., Lu, M., Gao, F., Cao, J., Zhu, H., Wang, M., 2015. Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Wei Sheng Wu Xue Bao* 55, 96–106.

Lokesh, J., Fernandes, J.M.O., Korsnes, K., Bergh, Ø., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -Glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 33, 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.017>

Martins, A.F.M., Pinheiro, T.L., Imperatori, A., Freire, S.M., Sá-Freire, L., Moreira, B.M., Bonelli, R.R., 2019. *Plesiomonas shigelloides*: A notable carrier of acquired antimicrobial resistance in small aquaculture farms. *Aquaculture* 500, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.040>

McIlroy, S.J., Saunders, A.M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A.A., Karst, S.M., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., 2015. MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database* 2015, bav062. <https://doi.org/10.1093/database/bav062>

Merrifield, D.L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S.J., Baker, R.T.M., 2009. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* 40, 1064–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02200.x>

Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, T.B.H., 2016. Dietary β -glucan (MacroGard[®]) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. Fish & Shellfish Immunology 48, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.013>

Miyake, S., Ngugi, D.K., Stingl, U., 2016. Phylogenetic diversity, distribution, and cophylogeny of giant bacteria (*Epulopiscium*) with their Surgeonfish hosts in the Red Sea. Frontiers in Microbiology 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00285>

Nelson, Joseph S., Terry C. Grande, and Mark VH Wilson. Fishes of the World. John Wiley & Sons, 2016.

Ngugi, D.K., Miyake, S., Cahill, M., Vinu, M., Hackmann, T.J., Blom, J., Tietbohl, M.D., Berumen, M.L., Stingl, U., 2017. Genomic diversification of giant enteric symbionts reflects host dietary lifestyles. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, E7592–E7601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703070114>

Petit, J., Wiegertjes, G.F., 2016. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. Developmental & Comparative Immunology. 64, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.003>

Pietretti, D., Vera-Jimenez, N.I., Hoole, D., Wiegertjes, G.F., 2013. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard[®] and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. Fish & Shellfish Immunology 35, 847–857. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.022>

Pilarski, F., Ferreira de Oliveira, C.A., Darpossolo de Souza, F.P.B., Zanuzzo, F.S., 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. Fish & Shellfish Immunology 70, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.059>

Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A., Romero, J., 2018. *Cetobacterium* is a major

component of the microbiome of giant amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. *Animals* 8, 189. <https://doi.org/10.3390/ani8110189>

Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I., 2004. From the cover: gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>

Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogh, Å., Olsen, R.E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H.L., Martinsen, L.L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., Merrifield, D.L., 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition* 22, 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>

Romero, J., Ringø, E., Merrifield, D.L., 2014. The gut microbiota of Fish, in: Merrifield, D., Ringø, E. (Eds.), *Aquaculture Nutrition*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 75–100. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>

Russo, P., Iturria, I., Mohedano, M.L., Caggianiello, G., Rainieri, S., Fiocco, D., Angel Pardo, M., López, P., Spano, G., 2015. Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3479–3490. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6351-x>

Salem, M., Gaber, M.M., Zaki, M.A., Nour, A.A., 2016. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition and intestine of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research* 47, 3516–3525. <https://doi.org/10.1111/are.12801>

Sang, H.M., Fotadar, R., 2010. Effects of dietary β – 1,3 – glucan on the growth, survival, physiological and immune response of marron, *Cherax tenuimanus* (smith, 1912). *Fish & Shellfish Immunology* 28, 957–960. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.020>

Santos, J.A., Rodríguez-Calleja, J.-M., Otero, A., García-López, M.-L., 2015. *Plesiomonas*, in: Molecular Medical Microbiology. Elsevier, pp. 1111–1123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00062-7>

Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Sruoga, A., Butkauskas, D., 2006. Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis. Fisheries Science 72, 597–602. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01189.x>

Skrodenytė-Arbačiauskienė, V., Sruoga, A., Butkauskas, D., Skrupskelis, K., 2008. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. Fisheries Science 74, 1307–1314. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01656.x>

Stephens, W.Z., Burns, A.R., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J.F., Guillemin, K., Bohannan, B.J.M., 2016. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. The ISME Journal 10, 644–654. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.140>

Sugita, H., Miyajima, C., Deguchi, Y., 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture 92, 267–276. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90028-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90028-6)

Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H., Deguchi, Y., 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. Aquaculture 145, 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01319-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01319-1)

Sugita, H., Takahashi, J., Miyajima, C., Deguchi, Y., 1991. Vitamin B₁₂ -Producing Ability of the Intestinal Microflora of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Agricultural and Biological Chemistry 55, 893–894. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870683>

Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'Connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S., Russell, J.A., 2012. Environmental and ecological factors

that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis: Fish gut bacterial communities. *Molecular Ecology* 21, 3363–3378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x>

Tran, N.T., Xiong, F., Hao, Y.-T., Zhang, J., Wu, S.-G., Wang, G.-T., 2017. Two biomass preparation methods provide insights into studying microbial communities of intestinal mucosa in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Research* 48, 4272–4283. <https://doi.org/10.1111/are.13248>

Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E.S., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J.L., Tringe, S.G., 2015. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00771>

Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H., 2007. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology* 0, 071018031740002-??? <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>

Wamala, S.P., Mugimba, K.K., Mutoloki, S., Evensen, Ø., Mdegela, R., Byarugaba, D.K., Sørum, H., 2018. Occurrence and antibiotic susceptibility of fish bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Clarias gariepinus* (African catfish) in Uganda. *Fisheries and Aquatic Sciences* 21. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0080-x>

Wong, S., Rawls, J.F., 2012. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment: News and Views: Perspective. *Molecular Ecology* 21, 3100–3102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05646.x>

Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., Liu, W.-T., 2014. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *The ISME Journal* 8, 541–551. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.181>

Zarkasi, K.Z., Abell, G.C.J., Taylor, R.S., Neuman, C., Hatje, E., Tamplin, M.L., Katouli, M., Bowman, J.P., 2014. Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. *Journal of Applied Microbiology* 117, 18–27. <https://doi.org/10.1111/jam.12514>

DISCUSSÃO GERAL

O estudo inovador da utilização do 1,3/1,6 β -glucano na incubação de ovos e embriões de tilápia-do-Nilo apresentados no primeiro manuscrito nos demonstrou resultados inesperados e promissores em relação ao desempenho produtivo das larvas, pois observamos que o imunoestimulante pode chegar ao intestino ainda em estágios iniciais de vida, apresentando um bom perfil modulador da microbiota, devido a estimulação de alguns genes importantes no desenvolvimento do peixe. Esta nova abordagem do uso do β -glucano abre uma discussão e espaço para diversas pesquisas sobre a utilização deste produto na incubação de ovos e embriões em soluções com β -glucano e seus efeitos em outros diversos parâmetros ainda não abordados pela ciência, tanto na tilápia do Nilo quanto em outras espécies de peixes.

O segundo manuscrito nos possibilitou avaliar o potencial do β -glucano residual da indústria de produção de álcool como um potencial ativador do sistema imune inato do pacu. Este glucano apresentou efeito positivo na ativação da atividade respiratória dos leucócitos. Com isto, este glucano torna-se economicamente interessante para a aquicultura por ser mais barato e com caráter sustentável, pois é proveniente de um material residual, ampliando a utilização deste produto pelos produtores e indústrias de nutrição animal, como consequência, colaborando para uma piscicultura mais saudável e competitiva.

Os conhecimentos gerados a partir do estudo da microbiota intestinal de pacu descritos no terceiro manuscrito são inéditos, por se tratar do primeiro trabalho utilizando a tecnologia de sequenciamento massivo abordando a diversidade bacteriana presente no intestino do pacu, trazendo informações primordiais para o entendimento da composição deste microbioma. Melhorar a compreensão das relações ecológicas dos microrganismos intestinais e a possibilidade da manipulação através da utilização de glucanos, antimicrobianos, extratos e óleos de alguns vegetais, bacteriocinas entre outros compostos que poderão ser utilizados com maior eficiência e ação dirigida à determinadas espécies. Mais especificamente, este trabalho possibilitou a compreensão da ação de diferentes produtos de 1,3/1,6 β -glucano no intestino de peixes alimentados com estas moléculas.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

Baptista, C., Dellova, D., Donati, G., Cezário, G., Real, J.V., Lino, J., Albuquerque, L., Santos, M., Oliveira, M., Vieira, R., 2018. Anuário peixe BR da piscicultura. Assoc. Bras. da Piscic. 71.

BIORIGIN. Em: <http://www.biorigin.net/biorigin/index.php/br/>. Acesso em: 25/10/2018.

Bittencourt, F., Feiden, A., Signor, A.A., Boscolo, W.R., Lorenz, E.K., Maluf, M.L.F., 2010. Densidade de estocagem e parâmetros eritrocitários de pacus criados em tanques-rede. Revista Brasileira de Zootecnia 39, 2323–2329. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100002>

Bricknell, I., Dalmo, R., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish & Shellfish Immunology 19, 457–472. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.008>

CONAB. 2017. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 3 - Safra 2016/17, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1–77.

Costa, L.F., 2004. Leveduras na nutrição animal. Revista Eletrônica Nutritime 1, 01–06.

Das, B.K., Debnath, C., Patnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Misrhra, B.K., 2009. Effect of β -glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). Fish & Shellfish Immunology 27, 678–683. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.002>

Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish & Shellfish Immunology 2, 287–297. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(06\)80033-1](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(06)80033-1)

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Faria, R.H.S. de, Souza, M.L.R. de, Wagner, P.M., Povh, J.A., Ribeiro, R.P., 2003. Rendimento do processamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757) e do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Acta Scientiarum. Animal Sciences 25. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v25i1.2068>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, 2014. The State of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. The Journal of Experimental Medicine 197, 1107–1117. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>

Gatlin, D.M III, Li P., 2004. Dietary supplementation of prebotics for health management of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. Aqua Feeds: Formulation & Beyond 1, 19–21.

Herre, J., Gordon, S., Brown, G.D., 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. Molecular Immunology 40, 869–876.

IBGE, IBGE Indicadores., 2016. Estatística da produção pecuária. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Malheiros, E.B., Portella, M.C., 2003. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. Aquaculture 221, 277–287. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00069-3)

Jory, D.E., Alceste, C., Cabrera, T.R., 2000. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. *Panorama Acuicola* 5, 50–53.

Jung-Schroers, V., Adamek, M., Jung, A., Harris, S., Dóza, ö.-S., Baumer, A., Steinhagen, D., 2016. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition* 22, 1026–1039. <https://doi.org/10.1111/anu.12320>

Kamilya, D., Maiti, T.K., Joardar, S.N., Mal, B.C., 2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of Fish Diseases* 29, 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00722.x>

Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D., Davies, S.J., 2014. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 279–289. <https://doi.org/10.1111/jpn.12078>

Lokesh, J., Fernandes, J.M.O., Korsnes, K., Bergh, Ø., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -Glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 33, 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.017>

Luque, J.L., 2004. Biología, epidemiología e controle de parasitos de peixes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13 (Supl 1), 161–165.

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 431–457. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5>

Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, T.B.H., 2016. Dietary

β -glucan (MacroGard[®]) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. Fish & Shellfish Immunology 48, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.013>

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.

Mulero, V., Esteban, M.A., Muñoz, J., Meseguer, J., 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology 8, 49–62. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0119>

Pavanelli, G.C., Eiras, J.D.C. and Takemoto, R.M., 2008. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. In Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento 305–305.

Petit, J., Wiegertjes, G.F., 2016. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. Developmental & Comparative Immunology 64, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.003>

Pietretti, D., Vera-Jimenez, N.I., Hoole, D., Wiegertjes, G.F., 2013. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard[®] and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. Fish & Shellfish Immunology 35, 847–857. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.022>

Pilarski, F., Ferreira de Oliveira, C.A., Darpossolo de Souza, F.P.B., Zanuzzo, F.S., 2017. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. Fish & Shellfish Immunology 70, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.059>

Przybylska-Diaz, D.A., Schmidt, J.G., Vera-Jiménez, N.I., Steinhagen, D., Nielsen, M.E., 2013. β -glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Shellfish Immunology 35, 998–1006.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.014>

Robertsen, B., 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 269–290. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0186>

Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R., Raa, J., 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases* 13, 391–400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00798.x>

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63–92. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00436-0)

Salah, A.S., El Nahas, A.F., Mahmoud, S., 2017. Modulatory effect of different doses of β -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology* 70, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.008>

Sang, H.M., Fotadar, R., 2010. Effects of dietary β – 1,3 – glucan on the growth, survival, physiological and immune response of marron, *Cherax tenuimanus* (smith, 1912). *Fish & Shellfish Immunology* 28, 957–960. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.020>

Schmidt, J.G., Andersen, E.W., Ersbøll, B.K., Nielsen, M.E., 2016. Muscle wound healing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 48, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.010>

Scholz, U., Garcia Diaz, G., Ricque, D., Cruz Suarez, L., Vargas Albores, F., Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176, 271–283. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00030-7)

Schulter, E.P.; Vieira Filho, J.E.R., 2017. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia, Texto para Discussão, No. 2328, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília

Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F., 2015. Identification of Bacterial Fish Pathogens in Brazil by Direct Colony PCR and 16S rRNA Gene Sequencing. *Advances in Microbiology* 05, 409–424. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56042>

Silva, J.R., Rabenschlag, D.R., Feiden, A., Boscolo, W.R., Signor, A.A., Bueno, G.W., 2012. Produção de Pacu em tanques-rede no reservatório de itaipu, Brasil: retorno econômico. *Archivos de Zootecnia* 61, 245–254. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922012000200009>

Takemoto, R.M., Lizama, M.A., Guidelli, G.M., e Pavanelli, G.C., 2004. Parasitos de peixes de águas continentais. In *Sanidade de organismos aquáticos* 1, 179–197.

Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases* 41, 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 10, 351–369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>

Vaz, M.M., Torquato, V.C., Barbosa, N.D.C., 2000. Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. Belo Horizonte: Cemig/Cetec.