

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO:
HEMATOIMUNOLOGIA, DESEMPENHO PRODUTIVO E
SOBREVIVÊNCIA DO TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)**

Suzana Kotzent

Bióloga

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO:
HEMATOIMUNOLOGIA, DESEMPENHO PRODUTIVO E
SOBREVIVÊNCIA DO TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)**

Discente: Suzana Kotzent

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana Pilarski

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutora em
Microbiologia Agropecuária**

2021

K87b	Kotzent, Suzana Bactérias com potencial probiótico: hematoimunologia, desempenho produtivo e sobrevivência do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) / Suzana Kotzent. -- Jaboticabal, 2021 95 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Fabiana Pilarski 1. <i>Colossoma macropomum</i>. 2. <i>Enterococcus hirae</i>. 3. <i>Lactococcus lactis</i>. 4. <i>Pediococcus pentosaceus</i>. 5. <i>Staphylococcus hominis</i>. I. Título.
------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO: HEMATOIMUNOLOGIA, DESEMPENHO PRODUTIVO E SOBREVIVÊNCIA DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

AUTORA: SUZANA KOTZENT

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP



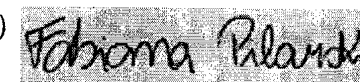
Profa. Dra. SÍLVIA UMEDA GALLANI (Participação Virtual)

Aquicultura (UNL/INPA) / Universidade Nilton Lins (UNL) - Manaus/AM



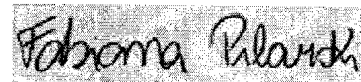
Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)

Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO (Participação Virtual)

Departamento de Aquicultura-Universidade Nilton Lins / Manaus/AM



Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO (Participação Virtual)

Laboratório de Genética / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP



Jaboticabal, 01 de julho de 2021

Dados curriculares da autora

Suzana Kotzent - Nascida em Ribeirão Preto/SP, em 26 de dezembro de 1988, graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Universidade Santa Cecília – Santos/SP, em 2010. Coursou Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal (SP) de março de 2015 a fevereiro de 2017, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em março de 2017 iniciou o Doutorado pelo mesmo programa com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (de março de 2017 a agosto de 2018) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (de setembro de 2018 a maio de 2021) e em julho de 2021 obteve o título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

Agradecimentos

À minha família, por toda atenção e amor. A minha mãe e meu irmão (Claudia e Pedro) por toda a base, estrutura e apoio que me proporcionaram durante toda a vida, a meu pai e minha avó (Francisco e Narmia) por me mostrarem a importância de pensar no futuro e lutar por meus ideais e as minhas irmãs (Marina e Gabriela) por todo incentivo e torcida. Amo vocês.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Pilarski, pelo apoio, amizade, por nunca me deixar desanimar e por me mostrar tudo com calma e confiança, por permitir que realizasse o mestrado e o doutorado em seu laboratório.

Ao Lindomar de O. Alves, Karen Dayana P. Mejia e Evandro B. Moro por toda ajuda nas coletas, nas análises e pela amizade nestes últimos anos, sem vocês não teria conseguido concretizar este estudo. Muito obrigada.

A Daiane V. da Silva, Inácio M. Assane, André do V. Oliveira, Elielma L. de Sousa e Fernando C. Gomes por me ajudarem nas coletas, vocês foram essenciais.

A Silvia U. Gallani e ao Gustavo M. R. Valladão que mesmo de longe estão sempre presentes, agradeço muito por todos os ensinamentos, ajuda e amizade.

Ao Profº Dr. Everlon Cid Rigobelo e a Roberta M. dos Santos pela ajuda na liofilização das bactérias.

Ao Allan, Rudnei e Camila pela ajuda nas análises realizadas no laboratório de fisiologia.

Aos colegas Juliana Christovam, André N. Silva e Leonardo M. Arikawa por me ajudarem nas coletas.

Ao Caunesp e a todos seus funcionários, em especial ao Valdecir, Marcio (perereca), Lucia, Elaine e Jamil, por toda estrutura e dedicação para que as pesquisas pudessem ser realizadas.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV/Unesp pela oportunidade de realização do curso, aos professores deste programa por todos ensinamentos, a todos funcionários, em especial a Branca Rochidali José e Marcia Luciana N. Santos, pelo apoio e dúvidas sanadas durante a execução e conclusão da Tese.

Aos professores Silvia U. Gallani, José Luiz P. Mouriño, Marita V. Cardozo, Everlon Cid Rigobelo, Gustavo M. R. Valladão e Diogo T. Hashimoto pelas correções e ajuda nas bancas de qualificação e defesa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2018/07553-9.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 Introdução	1
2 Revisão de literatura	2
2.1 Tambaqui: características, principais enfermidades e utilização de antimicrobianos.....	2
2.2 Probióticos na aquicultura.....	4
2.2.1 Modo de ação dos probióticos	5
2.2.2 Principais microrganismos utilizados como probiótico na aquicultura.....	6
2.2.2.1 <i>Enterococcus hirae</i>	6
2.2.2.2 <i>Lactococcus lactis</i>	7
2.2.2.3 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	8
2.2.2.4 <i>Staphylococcus hominis</i>	9
2.3 Aspectos sobre a saúde dos peixes	10
2.3.1 Hematologia.....	10
2.3.2 Bioquímica	11
2.3.3 Imunologia	12
3 Objetivos	13
4 Referências	14
CAPÍTULO 2 – Administração de bactérias autóctones potencialmente probióticas na alimentação de tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>).....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	25
1 Introdução	26
2 Materiais e Métodos.....	27
2.1 Bactérias	27
2.2 Preparo da dieta	28
2.3 Condição experimental	29
2.4 Parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos	29
2.5 Histoquímica intestinal	30

2.6 Forma de análise dos resultados	31
3 Resultados	31
3.1 Análises hematológicas	31
3.2 Análises bioquímicas	34
3.3 Análises imunológicas	36
3.4 Análise da histoquímica intestinal	38
4 Discussão.....	41
5 Referências	45
CAPÍTULO 3 – A seleção <i>in vitro</i> de bactérias ácido lácticas garante sua eficácia <i>in vivo</i> para o tabaqui?	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1 Introdução	53
2 Materiais e Métodos.....	54
2.1 Bactérias.....	54
2.2 Preparo da dieta	55
2.3 Condição experimental	56
2.4 Parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos	57
2.5 Índice hepatossomático	58
2.6 Desempenho produtivo.....	58
2.7 Resistência à infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i>	58
2.8 Histoquímica intestinal	59
2.9 Análise da composição microbiana intestinal	59
2.10 Forma de análise dos resultados	60
3 Resultados	60
3.1 Análises hematológicas	60
3.2 Análises bioquímicas	62
3.3 Análises imunológicas	63
3.4 Índice hepatossomático	64
3.5 Desempenho produtivo.....	64
3.6 Resistência à infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i>	66
3.7 Histoquímica intestinal	67
3.8 Análise da composição microbiana intestinal	69
4 Discussão.....	70

5 Referências	75
CAPÍTULO 4 – Considerações finais	82

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Probiótico para tambaqui (*Colossoma macropomum*): efeitos sobre o desempenho produtivo, sobrevivência, hematoimunologia e avaliação intestinal**", protocolo nº 005339/18, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	19/04/2018 a 06/02/2021
Espécie / Linhagem	<i>Colossoma macropomum</i>
Nº de animais	680
Peso / Idade	5 – 500g
Sexo	Indefinido
Origem	Laboratório de Reprodução de peixes nativos - CAUNESP

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.


Prof. Dr. Everton Cid Rigobelo
Vice-Coordenador – CEUA

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO: HEMATOIMUNOLOGIA,
DESEMPENHO PRODUTIVO E SOBREVIVÊNCIA DO TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)**

RESUMO – Os probióticos são microrganismos que contribuem para a melhora de um ou mais fatores na saúde do hospedeiro. Na aquicultura, o uso de probióticos é evidenciado na melhora das respostas imunológicas e sobrevivência às infecções, no desempenho produtivo, além da melhora na qualidade do ambiente de produção. Para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), a espécie de peixe nativo mais produzido no Brasil, não há qualquer probiótico autóctone para ser comercializado como aditivo alimentar. Desta forma, neste trabalho foram avaliados o efeito de cepas autóctones com potencial probiótico na saúde e desempenho do tambaqui. Em um primeiro experimento, foi investigada a ação imunoestimulante de quatro cepas bacterianas selecionadas em estudo prévio: *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus hominis*. As cepas liofilizadas foram incorporadas na dieta à 10^6 UFC/g de ração, e os peixes foram alimentados durante 60 dias com as quatro dietas experimentais além do grupo controle. Análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas foram realizadas nos dias 0, 7, 15, 30, 45 e 60. No dia 60, foi analisada a histoquímica intestinal de todos os grupos experimentais. No segundo experimento, as bactérias *L. lactis* e *P. pentosaceus* foram adicionadas separadamente a dieta em suspensão de PBS nas concentrações 10^7 e 10^9 UFC/g de ração, mais um grupo controle. As dietas foram fornecidas aos animais durante 58 dias, e durante este período, nos dias 0, 15, 30 e 58 foram avaliados os parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e desempenho produtivo. No dia 58 foram avaliados também o índice hepatossomático, histoquímica intestinal, a composição microbiana intestinal e a resistência à infecção por *Aeromonas hydrophila*. Os resultados encontrados no primeiro experimento demonstraram aumento significativo da atividade respiratória dos leucócitos nos peixes que receberam a ração contendo as bactérias *L. lactis* e *P. pentosaceus*, desta forma estas cepas foram selecionadas para o segundo experimento. No segundo estudo, as bactérias modularam a microbiota intestinal dos peixes, sem alterar os parâmetros fisiológicos. Com base nestes resultados, novos estudos devem ser realizados para elucidar a ação de probióticos no tambaqui, visto a baixa responsividade a este tipo de aditivo para esta espécie.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis*

**BACTERIA WITH PROBIOTIC POTENTIAL: HEMATOIMMUNOLOGY,
PRODUCTIVE PERFORMANCE AND TAMBAQUI SURVIVAL (*Colossoma
macropomum*)**

ABSTRACT – Probiotics are microorganisms that contribute to the improvement of one or more factors in the health of the host. In aquaculture, the use of probiotics is evidenced in the improvement of immune responses and survival to infections, productive performance, in addition to improving the quality of the production environment. For tambaqui (*Colossoma macropomum*), the most produced native fish species in Brazil, there is no indigenous probiotic to be marketed as a food additive. Thus, in this work, the effect of autochthonous strains with probiotic potential on the health and performance of tambaqui was evaluated. In a first experiment, the immunostimulant action of four bacterial strains selected in a previous study was investigated: *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus hominis*. The freeze-dried strains were incorporated into the diet at 10^6 CFU/g of ration, and the fish were fed for 60 days with the four experimental diets in addition to the control group. Hematological, biochemical and immunological analyzes were performed on days 0, 7, 15, 30, 45 and 60. On day 60, the intestinal histochemistry of all experimental groups was analyzed. In the second experiment, the bacteria *L. lactis* and *P. pentosaceus* were added separately to the PBS suspension diet at concentrations 10^7 and 10^9 CFU/g of feed, plus a control group. The diets were fed to the animals for 58 days, and during this period, on days 0, 15, 30 and 58, the hematological, biochemical, immunological and productive performance parameters were evaluated. On day 58, the hepatosomatic index, intestinal histochemistry, intestinal microbial composition and resistance to infection by *Aeromonas hydrophila* were also evaluated. The results found in the first experiment showed a significant increase in the respiratory activity of leukocytes in fish that received the diet containing the bacteria *L. lactis* and *P. pentosaceus*, thus these strains were selected for the second experiment. In the second study, the bacteria modulated the intestinal microbiota of fish, without changing the physiological parameters. Based on these results, further studies should be carried out to elucidate the action of probiotics on tambaqui, given the low responsiveness to this type of additive for this species.

Keywords: *Colossoma macropomum*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis*

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 Introdução

A aquicultura é o setor de produção animal com maior e mais rápido crescimento (Van Doan et al., 2019), pois desempenha um papel importante para atingir a demanda global por proteína alimentar de origem animal (Chauhan e Singh, 2019). Porém, esta prática enfrenta desafios para aumentar a quantidade e a qualidade da produção, sem impactar a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas explorados (Aubin et al., 2017). Mas, mesmo assim, é eminente que a intensificação aumenta o estresse ambiental e dos animais aquáticos (Dossou et al., 2018), tendo como resultando em surtos de doenças que enfraquecem a produção e ameaça a sustentabilidade do setor (Dawood et al., 2018).

Como tentativa de prevenção e controle das enfermidades em peixes, houve aumento substancial no uso empírico de antimicrobianos de amplo espectro, levando ao desenvolvimento de inúmeras cepas de bactérias resistentes, o que apresenta um risco potencial para a saúde pública pois, podem deixar resíduos no pescado e no meio ambiente podendo impactar toda a cadeia produtiva (Fečkaninová et al., 2017; Akanmu, 2018). Além disso, o uso off-label desses fármacos pode prejudicar a saúde dos peixes, uma vez que podem alterar drasticamente a microbiota intestinal do animal (Mamun et al., 2019). Assim, o desenvolvimento de alternativas naturais que previnam doenças e atuem como e promotoras de crescimento tornaram-se importante e urgentes para animais aquáticos (Dawood et al., 2018). Tendo em vista esses fatores, os probióticos têm se destacado pois não produzem resíduos nos animais, minimiza os impactos negativos no meio ambiente (Chauhan e Singh, 2019), além de não acarretar em resistência bacteriana, tornando-se ótimos substitutos aos antimicrobianos (Zuo et al., 2019).

A utilização de microrganismos como probióticos na aquicultura vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas por ser uma ótima alternativa sustentável (Banerjee e Ray, 2017).

2 Revisão de literatura

2.1 Tambaqui: características, principais enfermidades e utilização de antimicrobianos

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816), também conhecido como black pacu e cachama é um peixe encontrado no Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia, porém restrito ao habitat natural nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco. Pertence a ordem Characiformes e a família Serrasalminidae, é a segunda maior espécie de peixe com escamas da América do Sul, podendo medir um metro de comprimento e pesar 30 Kg (Goulding e Carvalho, 1982).

Essa espécie é considerada verdadeiramente tropical, pois em temperaturas abaixo de 22°C apresenta um crescimento muito lento (Ranzani-Paiva et al., 1999) e pode morrer se a temperatura da água ficar abaixo de 15°C durante alguns dias, desta forma a propagação natural destes animais é reduzida em regiões onde a temperatura da água fica entre 15 - 18°C durante as estações mais frias (Woynárovich e Van Anrooy, 2019).

O tambaqui é um peixe que se destaca na produção por sua rusticidade, apresenta alta tolerância à baixo pH e hipóxia extrema (Wood et al., 2017), é onívoro e apresenta alto índice de crescimento e eficiência alimentar (Guimarães et al., 2014; Reis et al., 2019), com capacidade de aproveitar alimentos naturais, como zooplâncton, mesmo quando adulto (Valladão et al., 2018), além de sementes e frutas (Woynárovich e Van Anrooy, 2019). Estas qualidades fazem com que atualmente esta espécie represente uma das principais para a produção em água continental na América do Sul (Valladão et al., 2018). Em 2019 a produção brasileira do tambaqui foi de 101.079,464 toneladas (IBGE, 2020).

Apesar das várias características favoráveis, as quais justificam sua importância na produção, o tambaqui, assim como todas as espécies produzidas sofre em decorrência da intensificação da produção e está susceptível aos problemas sanitários intrínsecos a este ambiente, sendo amplamente afetado por diferentes parasitos e bactérias (Valladão et al., 2018) que podem acarretar graves perdas econômicas.

Dentre os principais agentes causadores de doenças bacterianas na aquicultura, destacam-se *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae* (Figueiredo e Leal, 2008). Para o tambaqui, essas informações de identificação das bacterioses ainda são escassas na literatura, porém suspeita-se que as bactérias *A. hydrophila* e *F. columnare* são as principais causadoras de surtos de mortalidade.

Na tentativa de controle e prevenção de diversas bacterioses, os produtores têm utilizado grande quantidade de antimicrobianos, podendo colocar em risco toda a cadeia produtiva, uma vez que estes produtos podem deixar resíduos no pescado, se o período de carência adequado não for respeitado, além de prejudicar a saúde destes peixes, pois os antimicrobianos podem alterar drasticamente a microbiota intestinal, resultando na quebra do mecanismo de defesa de primeira linha (Mamun et al., 2019), além de afetar animais não alvos e o meio ambiente (Hu et al., 2014). Pode provocar ainda o surgimento de cepas bacterianas resistentes a estes medicamentos (Levy e Marshall, 2004).

Os antimicrobianos são os principais fármacos usados para o controle de bacterioses, e por muitos anos foram incorporados nas dietas de peixes em níveis subterapêuticos, com a intenção de promover benefícios além da redução de mortalidade, como a melhoria no desempenho produtivo, principalmente devido ao aumento da taxa de crescimento específico e do ganho de peso (Ringø et al., 2020). Porém, os perigos relacionados ao uso de antimicrobianos na aquicultura é eminente e incluem resíduos de antimicrobianos em produtos da aquicultura e o desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Fečkaninová et al., 2017), destacadas por inúmeros pesquisadores, é ainda mais agravante no caso do tambaqui, uma vez que todos os fármacos usados nesta espécie ocorrem de forma empírica. Essas bactérias resistentes aos medicamentos podem atuar como reservatórios de genes de resistência, a partir dos quais os genes podem se disseminar para patógenos humanos. Essa disseminação indireta da resistência antimicrobiana de ambientes aquáticos para humanos é realizada por transferência horizontal de genes. Ainda, patógenos de organismos aquáticos resistentes aos antimicrobianos podem ser também patógenos para humanos, ocasionando uma

disseminação direta da resistência antimicrobiana do ambiente aquático (Heuer, 2009).

Em função destes e de outros problemas provenientes da utilização de antimicrobianos, sejam de ordem econômica, metodológica ou sanitária, devem ser estudadas alternativas que promovam a diminuição de sua utilização na aquicultura, sem causar perdas de produtividade e da qualidade final do pescado, como por exemplo, o uso de probióticos (Meurer, 2005).

2.2 Probióticos na aquicultura

O termo probiótico é originário das palavras Gregas “pro” e “bios” que em conjunto querem dizer “a favor da vida”. A primeira definição de probiótico foi descrita por Lilly e Stillwell (1965) sendo definidas como, substâncias produzidas por protozoários que estimulariam o crescimento de outros microrganismos. Fuller (1989) definiu probióticos como suplemento alimentar microbiano vivo que afeta de forma benéfica o hospedeiro, melhorando seu equilíbrio microbiano. Uma melhor definição foi descrita por Verschuere et al. (2000) no qual probiótico é um microrganismo vivo que confere efeito benéfico ao hospedeiro, modificando a população microbiana associada ao hospedeiro ou ambiente, garantindo um melhor uso do alimento ou melhorando seu valor nutricional, melhorando a resposta do hospedeiro à doença ou a qualidade do seu ambiente.

Uma das definições que melhor se encaixa no cenário atual da aquicultura foi descrita por Merrifield et al. (2010), no qual define probiótico como qualquer célula microbiana fornecida por meio da dieta ou da água de criação que beneficia o hospedeiro, o piscicultor e/ou o consumidor de peixe, o que é alcançado, pelo menos em parte, melhorando o equilíbrio microbiano destes animais.

Apesar destas afirmações de que para serem considerados probióticos os microrganismos utilizados devem estar vivos, há pesquisadores que definem probióticos como suplementos alimentares microbianos vivos e/ou mortos ou aditivos de água na forma de cepas mono, múltiplas ou em combinação com prebióticos ou outros imunostimulantes, que são administrados para melhorar a qualidade da água

de criação, para melhorar as respostas fisiológicas e imunológicas de animais aquáticos (Dawood et al., 2017b).

Microrganismos probióticos podem ser oferecidos através da administração oral na dieta ou por imersão através de banho. Ainda, podem ser fornecidos individualmente ou em combinação, podem ser inativadas, apenas esporos, e a administração pode ser contínua ou intervalada, regulares ou coadministradas juntamente com prebióticos (simbióticos) ou produtos vegetais (Ringø et al., 2020).

Outro fator importante a ser levado em consideração é a fonte de isolamento dos microrganismos a serem utilizados como probióticos. Na aquicultura, isto ainda não está bem definido se isolados do próprio hospedeiro têm maior eficiência que isolados de outras origens, como solo, água ou outros animais. Contudo, há evidências que demonstram efeitos benéficos no uso de probióticos isolados do próprio hospedeiro do que os isolados de outras fontes (Lazado et al., 2015). Uma possível razão para seu desempenho superior pode ser por eles estarem melhor familiarizados com o ambiente intestinal do hospedeiro (Van Doan et al., 2019; Kotzent et al., 2021).

2.2.1 Modo de ação dos probióticos

Os probióticos não têm um modo de ação específico, mas desempenham um papel fundamental nas respostas imunológicas do hospedeiro e na interação entre essas respostas e comunidades bacterianas intestinais (Dawood e Koshio, 2016).

No geral, estes microrganismos podem auxiliar o estabelecimento da microbiota intestinal benéfica, funcionando como barreira à fixação e movimentação de microrganismos patogênicos, antígenos e outras substâncias nocivas ao epitélio (Lazado e Caipang, 2014). Podem agir na prevenção de doenças, através da produção de substâncias inibidoras (ácidos orgânicos e bacteriocinas) e ácidos graxos de cadeia curta (Hoseinifar et al., 2017).

Os probióticos conseguem ainda modular as citocinas liberadas pelas células imunes inata e adaptativa (Lazado e Caipang, 2014), através do sistema complemento sérico, atividade fagocítica, atividade da lisozima, atividade respiratória dos leucócitos (burst oxidativo), produção aumentada de anticorpos e fosfatase ácida (Srivastava e

Pandey, 2015; Mamun et al. 2019). Produzem compostos antimicrobianos que impedem a colonização de patógenos bacterianos que causam danos ao hospedeiro por meio da exclusão competitiva (Nayak, 2010), além de produzirem enzimas digestivas suplementares que melhoram a absorção de nutrientes e com isso, promovem maior desempenho produtivo dos peixes (Verschuere et al., 2000), melhoram também a qualidade da água (Balcázar et al., 2006; Kuebutornye et al., 2019), a resistência dos animais contra o estresse causado por diversos fatores ambientais (Zorriehzahra et al., 2016) e aumentam a taxa de crescimento dos animais nos sistemas de produção (Verschuere et al., 2000), melhorando a qualidade da carne e carcaça e reduzindo a quantidade de malformações (Merrifield et al., 2010).

2.2.2 Principais microrganismos utilizados como probiótico na aquicultura

Muitos gêneros de microrganismos já foram descritos para utilização como probiótico na aquicultura, dentre eles destacam-se: *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Burkholderia*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pediococcus*, *Phaeobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospiridium*, *Roseobacter*, *Saccharomyces*, *Shewanella*, *Streptomyces* e *Vibrio* (descritos em ordem alfabética e não de relevância) (Ringø et al., 2020; Nayak, 2010; Van Hai, 2015).

Para tambaqui, o primeiro relato do isolamento de bactérias autóctones com potencial probiótico na literatura foi realizado por Dias et al. (2018), que isolaram uma cepa de *Bacillus cereus*, seguido por Kotzent et al. (2021), que isolaram seis cepas, sendo elas: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus saprophyticus*.

2.2.2.1 *Enterococcus hirae*

Enterococcus hirae é uma espécie bacteriana do Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales e Família Enterococcaceae. São cocos Gram-positivos,

anaeróbios facultativos, não esporulados, não-hemolíticos, ácido-lático. Conseguem sobreviver em temperaturas entre 5°C e 65°C, porém, para seu crescimento ótimo, a temperatura deve estar em torno de 35°C e pH entre 4,5 e 10, com o pH ótimo em torno de 7,0. Com estas características conseguem sobreviver numa ampla gama de habitats (Fisher e Phillips, 2009; Gupta e Tiwari, 2015).

Para a aquicultura, esta espécie bacteriana já foi testada *in vitro* por alguns pesquisadores. Para a carpa indiana (*Catla catla*), esta bactéria quando testada *in vitro* foi resistente às condições ácidas dos sais biliares e suco gástrico, além de possuir atividades antimicrobianas e antioxidantes, características que a tornam uma promissora bactéria probiótica (Adnan et al., 2017).

Assim como Adnan e colaboradores, Kotzent et al. (2021) isolaram esta espécie do intestino de tambaquis e encontraram *in vitro*, resultados positivos como antagonismo contra *Aeromonas hydrophila*, tolerância à bile, susceptibilidade aos antimicrobianos e segurança para o hospedeiro quando testada *in vivo*.

Sua bacteriocina, conhecida como hiracina, é bastante estudada por possuir atividade antibacteriana contra patógenos transmitidos por alimentos, como a *Listeria monocytogenes* (Sánchez et al., 2008). Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente com a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos intimamente relacionados ou uma gama diversificada (Farkas-Himsley, 1980; Gálvez et al., 2014).

2.2.2.2 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis é uma espécie bacteriana do Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales e Família Streptococcaceae. São cocos Gram-positivos, medem de 0,5 a 1,5 µm, não esporulados, imóveis, hemólise-negativa, são ácido-láticas e crescem em temperaturas entre 30°C e 40°C, com a temperatura ótima em torno de 37°C.

A utilização de *L. lactis* na aquicultura foi descrita por Wong et al. (2020) demonstraram em um estudo com camarões branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) alimentados com dietas contendo *Bacillus subtilis*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. lactis* e oxitetraciclina em diferentes concentrações. Estes autores

demonstram que *L. lactis* proporcionou maiores benefícios aos camarões quando comparada ao controle em diversos parâmetros como, desempenho produtivo, atividade da superóxido dismutase, atividade da lisozima, histologia intestinal (intestinos mais saudáveis) e expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, indicando que *L. lactis* pode ser um probiótico ideal para esta espécie de camarão.

Para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), Zhou et al. (2010) observaram melhora no desempenho produtivo, nas concentrações de proteína sérica e globulina e nas respostas imunológicas dos animais alimentados com *L. lactis* comparados ao grupo controle.

Em linguados (*Paralichthys olivaceus*) uma cepa de *L. lactis* conferiu maior desempenho produtivo e maior sobrevivência contra estreptococose causada por *Streptococcus parauberis* por meio de exclusão competitiva e aumento da resposta imune inata (Nguyen et al., 2017a).

A bacteriocina produzida por este gênero é a mais conhecida e estudada, sendo esta a única aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) conhecida como nisina, a qual é utilizada como biopreservativo em alimentos (Shin et al., 2016).

2.2.2.3 *Pediococcus pentosaceus*

Pediococcus pentosaceus é uma espécie bacteriana do Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales e Família Lactobacillaceae. São cocos, Gram-positivos, medem de 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, apresenta-se em forma tetraédrica, pois sua divisão ocorre em duas direções, são imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, não-hemolíticos, caracterizadas como ácido-láticas, a temperatura para seu crescimento pode variar de 35°C a 40°C.

Há cada vez mais evidências experimentais indicando que esta espécie pode ser utilizada como biopreservativo de alimentos, plantas, animais ou como um possível candidato probiótico emergente (Jiang et al., 2021).

Nara aquicultura, *P. pentosaceus* já foi testada como probiótico por diversos pesquisadores, como Ahmadifar et al. (2020), que relataram que sua utilização resultou em melhora do desempenho produtivo, atividade de enzimas digestivas e

resposta imunológica de carpa comum (*Cyprinus carpio*). Gong et al. (2019), demonstraram que em carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) a utilização desta cepa como probiótico melhora a sobrevivência de animais desafiados contra *Aeromonas hydrophila*, coloniza o intestino, aumenta o número de células caliciformes e vilosidades intestinais e melhora o desempenho produtivo.

Para Adel et al. (2017), a inclusão de *P. pentosaceus* na dieta de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) aumentou o desempenho produtivo, a utilização da ração, melhorou a atividade das enzimas digestivas, a contagem de bactérias intestinais e a condição de saúde do camarão através da melhoria de vários parâmetros imunológicos, como aumento de hemócitos, atividade da lisozima e induziu maior resistência ao *Vibrio anguillarum*.

Ainda, a bacteriocina produzida por *P. pentosaceus* é conhecida como pediocina, ela faz parte de um grupo de bacteriocinas classe II-a com propriedade antimicrobiana, que significa que são pequenas proteínas estáveis ao calor e que faz parte do maior subgrupo destas substâncias (Ghosh et al., 2019). Estas pediocinas desempenham papéis antibacterianos eficazes no ecossistema microbiano e todas as bacteriocinas já encontradas estão listadas no trabalho de Jiang et al. (2021).

2.2.2.4 *Staphylococcus hominis*

Staphylococcus hominis é uma bactéria do Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Bacillales e Família Staphylococcaceae. São células esféricas com 1,0 - 1,5 µm de diâmetro, sua apresentação é individual, aos pares ou em arranjos tétrades. São Gram-positivos, imóveis, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não-hemolíticos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo. As colônias são geralmente opacas, podendo variar sua coloração (branca, creme, amarela ou laranja), geralmente catalase positiva. A temperatura ótima varia entre 30°C a 37°C (Kloos e Schleifer, 1975). Estão entre os microrganismos não esporulados mais resistentes.

S. hominis já foi utilizada como probiótico contra *Staphylococcus aureus* isolados da vagina de mulheres saudáveis (Sung et al., 2010), mas ainda não foram

encontrados relatos desta espécie sendo utilizada como probiótico diretamente na aquicultura.

Rajeswari et al. (2016) descreveram um metabólito secundário de *S. hominis*, que é um biosurfactante fosfolipopeptídico, o qual foi utilizado na tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) como um imunoestimulante promissor, que pode ser utilizado na aquicultura para prevenir doenças e surtos de doenças.

O efeito de uma espécie probiótica sobre a microbiota intestinal é provavelmente determinado pela produção de bacteriocinas (Angelakis, 2017). A bacteriocina de *S. hominis* é a homicina, um peptídeo antimicrobiano que segundo Kim et al. (2010) pode ser um terapêutico alternativo ao uso de alguns antimicrobianos, pois exibe espectro antibacteriano contra várias espécies Gram-positivas que são resistentes aos antimicrobianos.

Kotzent et al. (2021) relataram efeitos promissores para esta espécie como probiótico para tambaqui, já que apresenta antagonismo com cepas patogênicas e quando testado *in vivo* foi segura para os peixes.

2.3 Aspectos sobre a saúde dos peixes

As análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas quando relacionadas, nos conferem entendimento sobre a saúde e bem estar dos animais.

2.3.1 Hematologia

Os parâmetros hematológicos são utilizados para facilitar o entendimento do estado de saúde dos peixes em resposta às mudanças relacionadas à nutrição e qualidade da água. Esta análise é importante para mostrar alterações fisiológicas além de fornecer informações para o diagnóstico e prognóstico de doenças (Fazio, 2019).

A análise hematológica é especialmente importante porque pode fornecer uma avaliação confiável por meios não letais (Satheeshkumar et al., 2012).

As principais análises realizadas em peixes são hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio

(VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem total e diferencial de leucócitos.

A função primária dos eritrócitos é o transporte de oxigênio, cuja extensão depende da quantidade de hemoglobina dentro da célula e do mecanismo de troca gasosa (Grant, 2015). Parâmetros hematológicos, incluindo Ht, Hb, RBC, e seus índices derivados, como VCM, HCM e CHCM, são particularmente conhecidos por indicar o estado eritrocitário e a capacidade de transporte de oxigênio em peixes (Houston, 1997).

Os trombócitos em peixes são semelhantes às plaquetas de mamíferos e são importantes no processo de coagulação, mas ao contrário das plaquetas, os trombócitos são células complexas (Tavares-Dias e Moraes, 2004) que participam de funções imunológicas e apresentam atividade fagocítica (Fink et al., 2015).

Os leucócitos são divididos principalmente em linfócitos, monócitos, neutrófilos, células granulocíticas especiais (CGE), eosinófilos e basófilos, estas células são especializadas em fagocitar e destruir agentes infecciosos, além de sinalizar ao hospedeiro para ativação de outros mecanismos de defesa (Zhao et al., 2016).

Todas estas análises sanguíneas podem ser utilizadas para avaliar o estado de saúde dos animais e suas condições. A contagem diferencial das células sanguíneas, incluindo concentração de hemácias e leucócitos, é um dos melhores indicadores hematológicos da saúde dos peixes porque pode indicar a presença de uma doença infecciosa (Grant, 2015).

2.3.2 Bioquímica

Análise dos parâmetros bioquímicos séricos são especialmente úteis para identificar órgãos-alvo de toxicidade, bem como o estado geral de saúde dos animais, e é recomendada para fornecer sinais precoces de modificações críticas em organismos estressados (Prakash and Verma, 2020).

Neste estudo, as análises realizadas foram, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), concentração de proteína total, albumina e globulina.

As enzimas ALT e AST são amplamente utilizadas como marcadores sensíveis para possíveis danos teciduais, particularmente toxicidade hepática ou danos aos hepatócitos, tanto em estudos de toxicologia não clínica quanto em ensaios clínicos (Ramaiah, 2007; Zadmajid e Mohammadi 2017).

A proteína total demonstra indiretamente a resposta imune humoral específica contra infestações bacterianas (Abdelghany et al., 2020).

A albumina é uma proteína do sangue e suas principais funções são a regulação osmótica, pressão sanguínea e transporte de metabólitos como os ácidos graxos, hormônios e bilirrubina (Fazio et al., 2016).

A globulina é importante para defesa e inclui as gamaglobulinas e uma variedade de enzimas e proteínas transportadoras (Fazio et al., 2016). A relação albumina:globulina é geralmente utilizada como índice da condição fisiológica (Savari et al., 2011).

2.3.3 Imunologia

A imunidade é um importante mecanismo fisiológico em animais para proteção contra infecções e preservação da homeostase interna (Saurabh e Sahoo, 2008).

Neste trabalho foram realizadas as seguintes análises imunológicas, atividade respiratória dos leucócitos (burst), atividade da lisozima e sistema complemento.

A atividade respiratória dos leucócitos é uma resposta imunológica essencial para eliminação de patógenos (Semple e Dixon, 2020). Após a ingestão de partículas estranhas, as células imunes podem matar a maioria das bactérias, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS), que catalisa a conversão de oxigênio molecular em ânions superóxido (Panday et al., 2015; Nguyen et al., 2017b), esta formação, se transforma em outras EROS, como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ácido hipocloroso, todas estas matam com eficiência os microrganismos fagocitados (DeLeo e Quinn, 1996).

O sistema complemento é um dos principais componentes do sistema imunológico inato dos peixes, sua ativação pode resultar na geração de fragmentos de proteínas ativadas que contribuem para a morte microbiana, fagocitose, reações inflamatórias, liberação do complexo imune e produção de anticorpos (Tong e Li,

2020). Este sistema pode ser ativado através de três vias principais: clássica (antígeno: complexos imunes de anticorpo), lectina (reconhecimento de PAMP por lectinas) e a via alternativa (hidrólise espontânea/superfícies patogênicas) (Dunkelberger e Song, 2010). A via alternativa é a mais descrita e utilizada para peixes. A ativação se inicia com a identificação de superfícies patogênicas e leva à geração de mediadores pró-inflamatórios potentes (anafilotoxinas), opsonização (revestimento) da superfície patogênica por meio de várias opsoninas do complemento (como C3b) e lise direcionada da superfície patogênica por meio do conjunto de poros que penetram na membrana conhecido como complexo de ataque à membrana (Vallejos-Vidal et al., 2016).

A lisozima é um dos principais grupos de moléculas inatas não específicas envolvidas na proteção do hospedeiro contra a invasão bacteriana (Li et al., 2021). Em peixes a lisozima sérica é produzida por leucócitos. Esta enzima desempenha um papel importante na imunidade por lisar a parede celular bacteriana e estimular a fagocitose das bactérias (Das et al., 2013). Ainda, sua atividade é uma das mais analisadas para avaliar a melhora da imunidade inata por imunoestimulantes (Vallejos-Vidal et al., 2016).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivos:

3 Objetivos

Selecionar a melhor cepa autóctone bacteriana dentre as espécies *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus hominis* para ser utilizada como probiótico na produção do tambaqui.

- Estudo 1: Comparar o efeito de quatro potenciais probióticos (*E. hirae*, *L. lactis*, *P. pentosaceus* e *S. hominis*) adicionados à alimentação de tambaquis na concentração de 10^6 UFC/g de ração através das respostas hematológicas, imunológicas, bioquímicas e histoquímica intestinal;

- Estudo 2: Avaliar o efeito das bactérias *L. lactis* e *P. pentosaceus* na alimentação de tambaquis nas concentrações de 10^7 e 10^9 UFC/g de ração na saúde geral, saúde intestinal, desempenho produtivo, sobrevivência ao desafio contra *Aeromonas hydrophila* e composição microbiana intestinal.

4 Referências

Abdelghany MF, El-Sawy HB, El-hameed SAAA, Khames MK, Abdel-Latif HMR, Naiel MAE (2020) Effects of dietary *Nannochloropsis oculata* on growth performance, serum biochemical parameters, immune responses, and resistance against *Aeromonas veronii* challenge in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology** 107: 277-288. Doi: 10.1016/j.fsi.2020.10.015

Adel M, Yeganeh S, Dawood MAO, Safari R, Radhakrishnan S (2017) Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition** 23(6): 1401-1409. Doi: 10.1111/anu.12515

Adnan M, Patel M, Hadi S (2017) Functional and health promoting inherent attributes of *Enterococcus hirae* F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the freshwater fish *Catla catla*. **PeerJ Life & Environment** 5: e3085 Doi: 10.7717/peerj.3085/supp-1

Ahmadifar E, Sadegh TH, Dawood MAO, Dadar M, Sheikhzadeh N (2020) The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture** 516: 734656. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734656

Akanmu OA (2018) Probiotics, an Alternative Measure to Chemotherapy in Fish Production. Probiotics - Current Knowledge and Future Prospects 151-168. Doi: 10.5772/intechopen.72923

Angelakis E (2017) Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis** 106: 162-170. Doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.002

Aubin J, Callier M, Rey-Valette H, Mathé S, Wilfart A, Legendre M, Slembrouck J, Caruso D, Chia E, Masson G, Blancheton JP, Ediwarman, Haryadi J, Prihadi TH, Casaca JM, Tamassia ST, Tocqueville A, Fontaine P (2019), Implementing ecological intensification in fish farming: definition and principles from contrasting experiences. **Reviews in Aquaculture** 11:149-167. Doi: 10.1111/raq.12231

Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL (2006) The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology** 114(3-4): 173-186. Doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Banerjee G, Ray AK (2017) The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science** 115:6-77. Doi: 10.1016/j.rvsc.2017.01.016

Chauhan A, Singh R (2019) Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. **Symbiosis** 77: 99-113. Doi: 10.1007/s13199-018-0580-1

Das R, Raman RP, Saha H, Singh R (2013) Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research** 46(5): 1111-1126. Doi: 10.1111/are.12264

Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, El Basuini MF, Hossain MS, Nhu TH, Dossou S, Moss AS (2016) Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology** 49: 275-285. Doi: 10.1016/j.fsi.2015.12.047

Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, El Basuini MF, Hossain MS, Nhu TH, Moss AS, Dossou S, Wei H (2017a) Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition** 23(1): 148-159. Doi: 10.1111/anu.12376

Dawood MAO, Koshio S, Esteban MA (2017b) Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture** 0: 1-25. Doi: 10.1111/raq.12209

Dawood MAO, Koshio S, Abdel-Daim MM, Van Doan H (2018) Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture** 11(3): 907-924. Doi: 10.1111/raq.12272

DeLeo FR, Quinn MT (1996) Assembly of the Phagocyte NADPH Oxidase: Molecular Interaction of Oxidase Proteins. **Journal of Leukocyte Biology** 60(6): 677-691. Doi: 10.1002/jlb.60.6.677

Dossou S, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Dawood MAO, El Basuini MF, El-Hais AM, Olivier A (2018) Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. **Aquaculture** 490: 228-235. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.010

Dunkelberger J, Song WC (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research** 20: 34-50. Doi: 10.1038/cr.2009.139

Farkas-Himsley H (1980) Bacteriocins-are they broad-spectrum antibiotics? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 6(4): 424-426. Doi: 10.1093/jac/6.4.424

Fazio F, Marafioti S, Sanfilippo M, Casella S, Piccione G (2016). Assessment of immune blood cells and serum protein levels in *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) and *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) collected from the Tyrrhenian sea coast (Italy). **Cahiers de Biologie Marine** 57(3): 235-240.

Fazio F (2019) Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. **Aquaculture** 500: 237-242. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.030

Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, Popelka P, Toropilová J (2017) The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. **Aquaculture** 469: 1-8. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.11.042

Figueiredo HS, Leal CAG (2008) Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37: 08-14. Doi: 10.1590/S1516-35982008001300002

Fink IR, Ribeiro CMS, Forlenza M, Taverne-Thiele A, Rombout JHWM, Savelkoul HFJ, Wiegertjes GF (2015) Immune-relevant thrombocytes of common carp undergo parasite-induced nitric oxide-mediated apoptosis. **Developmental & Comparative Immunology** 50(2): 146-154. Doi: 10.1016/j.dci.2015.02.008

Fisher K, Phillips C (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology** 155(6): 1749-57. Doi: 10.1099/mic.0.026385-0

Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66(5): 365-78.

Gálvez MJG, Burgos RL, López RP (2014) Pulido Food biopreservation Springer. Briefs in Food, Health, and Nutrition. Food Biopreservation. Springer, New York, NY. 3-14 p.

Ghosh B, Sukumar G, Ghosh AR (2019) Purification and characterization of pediocin from probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4, MTCC 12683. **Folia Microbiology** 64: 765-778. Doi: 10.1007/s12223-019-00689-0

Gong L, He H, Li D, Cao L, Khan TA, Li Y, Pan L, Yan L, Ding X, Sun Y, Zhang Y, Yi G, Hu S, Xia L (2019) A new isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps. **Frontiers in Microbiology** 10: 1384. Doi: 10.3389/fmicb.2019.01384

Goulding M, Carvalho ML (1982) Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia** 1(2): 107-133. Doi: 10.1590/S0101-81751982000200001

Guimarães IG, Miranda EC, Araújo JG (2014) Coefficients of total tract apparent digestibility of some feedstuffs for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Animal Feed Science and Technology** 188:150-155. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.11.0

Gupta A, Tiwari SK (2015) Probiotic potential of bacteriocinproducing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. **Annals of Microbiology** 65(4): 2333-2342. Doi: 10.1007/s13213-015-1075-4

Grant KR (2015) Fish hematology and associated disorders. **The Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice** 18(1): 83-103. Doi: 10.1016/j.cvex.2014.09.007.

Heuer EO, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ (2009) Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. **Clinical Infectious Diseases** 49: 1248-1253. Doi: 10.1086/605667

Hoseinifar SH, Sun YZ, Caipang CM (2017) Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. **Aquaculture Research** 48(4): 1380-1391. Doi: 10.1111/are.13239

Houston AH (1997) Review: are the classical haematological variables acceptable indicators of fish? **Transactions of the American Fisheries Society** 126(6): 879-894. Doi: 10.1577/1548-8659

Hu FY, He LM, Yang JW, Bian K., Wang ZN, Yang HC, Liu YH (2014) Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B** 949-950: 79-86. Doi: 10.1016/j.jchromb.2014.01.008

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020) **Produção da aquicultura**. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21>)

Jiang S, Cai L, Lv L, Li L (2021) *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. **Microbial Cell Factories** 20: 45. Doi: 10.1186/s12934-021-01537-y

Kim PI, Sohng JK, Sung C, Joo HS, Kim EM, Yamaguchi T, Park D, Kim BG (2010) Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominisin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 399(2): 133-138. Doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.024

Kloos WE, Schleifer KH (1975) Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology** 25(1): 62-79. Doi: 10.1099/00207713-25-1-62

Kotzent S, Gallani SU, Valladão GMR, Alves LO, Pilarski F (2021) Probiotic potential of autochthonous bacteria from tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Research** 52(5): 2266-2275. Doi: 10.1111/are.15078

Kozasa M (1986) Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiology Aliments Nutrition** 4: 121-135.

Kuebutornye FKA, Abarike ED, Lu Y (2019) A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology** 87: 820-828. Doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.010

Lazado CC, Caipang CMA (2014) Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. **Journal Applied Microbiology** 116(4): 990-998. Doi: 10.1111/jam.12414

Lazado CC, Caipang CM, Estante EG (2015) Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. **Fish & Shellfish Immunology** 45(1): 2-12. Doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.023.

Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine** 10(1): 122-129. Doi: 10.1038/nm1145

Li L, Cardoso JCR, Félix RC, Mateus AP, Canário AVM, Power DM (2021) Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development. **Developmental & Comparative Immunology** 114: 103772. Doi: 10.1016/j.dci.2020.103772

Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science** 147(3659): 747-8. Doi: 10.1126/science.147.3659.747

Mamun MAA, Nasren S, Rathore SS, Sidiq, MJ, Dharmakar P, Anjusha KV (2019) Assessment of Probiotic in Aquaculture: Functional Changes and Impact on Fish Gut. **Microbiology Research Journal International** 29(1): 1-10. Doi: 10.9734/mrji/2019/v29i130156

Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bogwald J, Castex M, Ringø E (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture** 302(1): 1-18. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.007

Meurer F, Hayashi C, Boscolo WR, Kavata LB, Lacerda CHF (2005) Nível de arraçoamento para alevinos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia** 34(6): 1835-1840. Doi: 10.1590/S1516-35982005000600006

Nayak SK (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**. 29(1): 2-14. Doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.017

Nguyen TL, Park C, Kim DH (2017a) Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. **Aquaculture** 471: 113-120. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.01.008

Nguyen GT, Green ER, Meccas J (2017b) Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 7: 373. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00373

Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S (2015) NADPH Oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular & Molecular Immunology** 12: 5-23. Doi: 10.1038/cmi.2014.89

Prakash S, Verma A (2020) Effect of arsenic on serum biochemical parameters of a fresh water cat fish, *Mystus vittatus*. **International Journal of Biological Innovations** 2(1):11-19. Doi: 10.46505/IJBI.2020.2102

Rajeswari V, Priyadarshini SK, Saranya V, Suguna P, Shenbagarathai R (2016) Immunostimulation by phospholipopeptide biosurfactant from *Staphylococcus hominis* in *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology** 48: 244-253. Doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.006

Ramaiah SK (2007) A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology** 45(9): 1551-1557. Doi: 10.1016/j.fct.2007.06.007

Ranzani-Paiva MJT, Salles FA, Eiras JC, Eiras AC, Ishikawa CM, Alexandrino AC (1999) Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do instituto de pesca, estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca** 25: 77-83.

Reis YS, Leite JLR, Almeida CAL, Pereira DSP, Vidal LVO, Araújo FG, Fortes-Silva R (2019) New insights into tambaqui (*Colossoma macropomum*) feeding behavior and digestive physiology by the self-feeding approach: effects on growth, dial patterns of food digestibility, amylase activity and gastrointestinal transit time. **Aquaculture** 498: 116-122. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.054

Ringø E, Van Doan H, Lee SH, Soltani M, Hoseinifar SH, Harikrishnan R, Song SK (2020) Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal Applied Microbiology** 29: 116-136. Doi: 10.1111/jam.14628

Sánchez J, Borrero J, Gómez-Sala B, Basanta A, Herranz C, Cintas LM, Cloning PEH (2008) Heterologous Production of Hiracin JM79, a Sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in Lactic Acid Bacteria and *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology** 74(8): 2471-2479. DOI: 10.1128/AEM.02559-07

Satheeshkumar P, Ananthan G, Senthilkumar D (2012) Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. **Comparative Clinical Pathology** 21: 275-281. Doi: 10.1007/s00580-010-1091-5

Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research** 39(3): 223-239. Doi: 0.1111/j.1365-2109.2007.01883.x

Savari A, Hedayati A, Safahieh A, Movahedinia A (2011) Characterization of blood cells and hematological parameters of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) in some creeks of Persian Gulf. **World Journal of Zoology** 6(1): 26-32.

Semple SL, Dixon B (2020) "Salmonid Antibacterial Immunity: An Aquaculture Perspective" **Biology** 9(10): 331. Doi: 10.3390/biology9100331

Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL (2016) Biomedical applications of nisin. **Journal Applied Microbiology** 120(6): 1449-1465. Doi: 10.1111/jam.13033

Srivastava PK, Pandey AK (2015) Role of immunostimulants in immuneresponses of fish and shellfish. **Biochemical and Cellular Archives** 15 (1):47-73.

Sung C, Kim BG, Kim S, Joo HS, Kim PI (2010) Probiotic potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 as anti-*Staphylococcus aureus* agent isolated from the vaginal microbiota of a healthy woman. **Journal Applied Microbiology** 108(3): 908-916. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04485.x

Tavares-Dias M, Moraes FR (2004) Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress. 144p.

Tong C, Li M (2020) Transcriptomic signature of rapidly evolving immune genes in a highland fish. **Fish & Shellfish Immunology** 97: 587-592. Doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.082

Vallejos-Vidal E, Reyes-López F, Teles M, MacKenzie S (2016). The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology** 56: 34-69. Doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.028

Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2018) South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture** 10(2): 351-369. Doi: 10.1111/raq.12164

Van Doan H, Hoseinifar SH, Ringø E, Esteban MA, Dadar M, Dawood MAO Faggio C (2019) Host-associated probiotics: A key factor in sustainable aquaculture. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture** 28: 16-42. Doi: 10.1080/23308249.2019.1643288

Van Hai N (2015) Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology** 45:592-597. Doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.026

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64(4):655-671. Doi: 10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000

Zadmajid V, Mohammadi CH (2017) Dietary thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) changes serum stress markers, enzyme activity, and hematological parameters in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to silver nanoparticles. **Iranian Journal of Fisheries Sciences** 16:1063-1084.

Zhao L, Tu J, Zhang Y, Wang J, Yang L, Wang W, Wu Z, Meng Q, Lin L (2016) Transcriptomic analysis of the head kidney of Topmouth culter (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway. **Fish & Shellfish Immunology** 57: 413-418. Doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.001

Zhou X, Wang Y, Yao J, Li W (2010) Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Engineering, Science and Technology** 2(7): 73-80. Doi: 10.4314/ijest.v2i7.63743

Zorriehzahra MJ, Delshad ST, Adel M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Lazado CC (2016) Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly** 36(4): 228-241. Doi: 10.1080/01652176.2016.1172132

Zuo Z, Shang B, Shao Y, Li W, Sun J (2019) Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology** 86: 160-168. Doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.003

Won S, Hamidoghli A, Choi W, Bae J, Jang WJ, Lee S, Bai SC (2020) Evaluation of Potential probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on growth performance, immune response, gut histology and immune-related genes in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms** 8(2): 281. Doi: 10.3390/microorganisms8020281

Wood CM, Souza Netto JG, Wilson JM, Duarte RM, Val AL (2017). Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. **Journal of Comparative Physiology B** 187(1): 135-151. Doi: 10.1007/s00360-016-1027-8

Woynárovich A, Anrooy RV (2019) Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624. Rome, FAO. 132 p.

CAPÍTULO 2 – Administração de bactérias autóctones potencialmente probióticas na alimentação de tambaquis (*Colossoma macropomum*)¹

Resumo

A utilização de probióticos na aquicultura é uma alternativa sustentável à utilização de antimicrobianos, além de beneficiar a saúde do hospedeiro. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as cepas autóctones *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis* na saúde de tambaquis (*Colossoma macropomum*) através de parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e histoquímica intestinal. Os peixes ($82,28 \pm 0,32$ g) foram alimentados com as cepas bacterianas nas concentrações de 10^6 UFC g⁻¹ de ração e uma dieta controle (sem adição de bactérias) e analisados nos dias 0, 7, 15, 30, 45 e 60. Os parâmetros hematológicos não apresentaram alterações comparados ao tratamento controle ($p > 0,05$). Quanto aos parâmetros bioquímicos, a ALT demonstrou diferença entre os tratamentos com *P. pentosaceus*, *E. hirae* e *S. hominis* no dia 7. Para a AST, o tratamento com *S. hominis* diferiu do grupo controle no dia 15 e a cepa *P. pentosaceus* diferiu no dia 30 após a alimentação. Nos parâmetros imunológicos, a atividade respiratória dos leucócitos foi maior nos peixes alimentados com ração suplementada com *L. lactis* e *P. pentosaceus* no dia 60. Com relação a histoquímica intestinal, todos os tratamentos, comparados ao grupo controle, apresentaram uma diminuição no número de células caliciformes na região anterior e os tratamentos *L. lactis* e *E. hirae* apresentaram aumento na região posterior. Contudo, a utilização das quatro cepas bacterianas não foi capaz de incrementar a saúde do hospedeiro em 60 dias.

Palavras-chave: aquicultura, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis*

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico nas normas da revista Aquaculture.

Administration of potentially probiotic autochthonous bacteria in the feeding of tambaquis (*Colossoma macropomum*)

Abstract

The use of probiotics in aquaculture is a sustainable alternative to the use of antimicrobials, in addition to benefiting the health of the host. This study aimed to evaluate the autochthonous strains *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* and *Staphylococcus hominis* in the health of tambaquis (*Colossoma macropomum*) through hematological, biochemical, immunological and intestinal histochemical parameters. The fish (82.28 ± 0.32 g) were fed with bacterial strains at concentrations of 10^6 CFU g⁻¹ of feed and a control diet (without addition of bacteria) and analyzed on days 0, 7, 15, 30, 45 and 60. The hematological parameters showed no changes compared to the control treatment ($p > 0.05$). As for biochemical parameters, ALT showed difference between treatments with *P. pentosaceus*, *E. hirae* and *S. hominis* on day 7. For AST, treatment with *S. hominis* differed from the control group on day 15 and the *P. pentosaceus* strain differed on day 30 after feeding. In immunological parameters, the respiratory activity of leukocytes was higher in fish fed with diet supplemented with *L. lactis* and *P. pentosaceus* on day 60. Regarding intestinal histochemistry, all treatments, compared to the control group, showed a decrease in the number of goblet cells in the anterior region and the treatments *L. lactis* and *E. hirae* showed an increase in the posterior region. However, the use of the four bacterial strains was not able to increase the host's health in 60 days.

Keywords: aquaculture, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis*

1 Introdução

Tambaqui *Colossoma macropomum* é atualmente a principal espécie nativa produzida na aquicultura continental da América do Sul (Gallani et al., 2020). No Brasil, a produção anual desta espécie é de aproximadamente 101.079,464 toneladas (IBGE, 2020). Esta alta produtividade é possível através da intensificação dos sistemas de criação, porém, esta prática de confinamento faz com que os animais fiquem constantemente expostos a estímulos estressores como consequência da elevada densidade de estocagem, manuseio inadequado e má qualidade da água, causando danos consideráveis, aumentando a ocorrência de surtos de doenças e enfraquecendo a produção, além de ameaçar a sustentabilidade desta prática (Dias et al., 2018; Dawood et al., 2018).

Na tentativa de reduzir os surtos e evitar a disseminação da doença para todo o plantel, antimicrobianos são amplamente utilizados. Quando usados de forma indiscriminada, podem desencadear múltiplos impactos negativos no meio ambiente, (como acúmulo de resíduos na água e no sedimento) e na saúde humana e do hospedeiro (com o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos disponíveis e acúmulo de resíduos destes produtos no pescado) (Fečkaninová et al., 2017). Com esta problemática, é crescente o número de esforços para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis para o controle de doenças na aquicultura (Chen et al., 2019). Dentre as alternativas promissoras para a prevenção de doenças na aquicultura, destacam-se os probióticos.

Nas últimas décadas, os probióticos têm sido utilizados como aditivos alimentares ecológicos e sustentáveis, além de uma alternativa ao uso de antimicrobianos, aumentando a imunidade dos peixes e resistência às doenças (Maas et al., 2021). Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Hill et al., 2014; Yi et al., 2018). Eles possuem algumas características que beneficiam o hospedeiro, como antagonismo as cepas patogênicas, capacidade de adesão e colonização na mucosa intestinal do hospedeiro, excluindo bactérias indesejadas e melhorando a funcionalidade do trato gastrointestinal, modulam a microbiota intestinal, produzem enzimas digestivas suplementares e nutrientes, melhoram as respostas imunológicas

além de ter efeito antiviral e melhorar a qualidade da água da piscicultura (Ringø et al., 2020).

Para o tambaqui, até o momento, apenas um probiótico autóctone foi testado *in vivo*, uma cepa de *Bacillus cereus* (Dias et al., 2018). Todavia, em outro estudo, quatro cepas com potencial probiótico para o tambaqui foram testadas *in vitro*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis* as quais apresentaram todas as características desejadas para uma bactéria probiótica (Kotzent et al., 2021). A importância da utilização de microrganismos isolados do próprio hospedeiro oferece algumas vantagens, como familiaridade com temperatura, salinidade e o ambiente de desenvolvimento (Zorriehzahra et al., 2016).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito probiótico *in vivo* de cepas autóctones previamente isoladas (*L. lactis*, *P. pentosaceus*, *E. hirae* e *S. hominis*) nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e histoquímica intestinal do tambaqui.

2 Materiais e Métodos

Todos os procedimentos adotados no estudo estão de acordo com as normas dos princípios éticos em pesquisa animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 005339/18.

2.1 Bactérias

As cepas bacterianas com potencial probiótico utilizadas neste trabalho foram previamente selecionadas de juvenis de tambaquis saudáveis através de testes *in vitro* (Kotzent et al., 2021) e estão depositadas no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA-CAUNESP) sob o número de acesso gerado pelo GenBank KY305683 (*Pediococcus pentosaceus*), KY305684 (*Lactococcus lactis*), KY305685 (*Enterococcus hirae*) e KY305686 (*Staphylococcus hominis*).

2.2 Preparo da dieta

Inicialmente as cepas com potencial probiótico (*L. lactis*, *P. pentosaceus*, *E. hirae* e *S. hominis*) previamente identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA, foram repicadas em placas de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Neogen, EUA) e submetidas a crescimento em estufa bacteriológica por 48 h a 35°C. A pureza das cepas foi avaliada através da análise das características morfológicas das colônias e do método da coloração de Gram. Após a confirmação da pureza, uma colônia de cada cepa foi adicionada individualmente em frascos estéreis de 1000 mL contendo caldo MRS (Neogen, EUA), para crescimento por 48 h em estufa a 35°C. Uma parte do caldo (cerca de 700 mL) foi centrifugado a 3000xg durante 10 min a 4°C para concentração da bactéria e após, foi adicionado 20% de leite em pó desnatado ao concentrado bacteriano e congelado a -20°C até o processo de liofilização. Este processo foi realizado em liofilizador VirTis (BenchTop K) durante 7 dias. Após esta etapa, as cepas foram armazenadas a -20°C até posterior utilização. Para análise quantitativa do liofilizado, o pó foi diluído seriadamente (10^{-2} a 10^{-9}) em solução salina tamponada de fosfato esterilizado (PBS) e plaqueado em ágar MRS para contagem total das colônias. Cada cepa foi adicionada à dieta experimental com óleo de soja (2%) na concentração 10^6 UFC g⁻¹ e o controle recebeu apenas o leite desnatado liofilizado juntamente com o óleo. A dieta base para todo o período experimental foi uma ração comercial (320 g Kg⁻¹ de proteína bruta, 50 g Kg⁻¹ de extrato etéreo, 100 g Kg⁻¹ de fibra bruta, 140 g Kg⁻¹ de matéria mineral, 15 g Kg⁻¹ de cálcio (mínimo), 30 g Kg⁻¹ de cálcio (máximo), 2,7 g Kg⁻¹ de fósforo, 120 g Kg⁻¹ de umidade, 0,2 g Kg⁻¹ de vitamina C) específica para peixes onívoros (Laguna – Socil, ADM).

A viabilidade dos probióticos nas dietas foi avaliada através de diluições seriadas de amostras de ração em PBS estéril, plaqueadas em ágar MRS para contagem de UFC g⁻¹ e as colônias identificadas através de sua morfologia, a ração controle também foi plaqueada para garantia da que não havia cepas probióticas em sua composição. Este processo, assim como o preparo das dietas foi repetido semanalmente para garantir a manutenção da concentração.

As concentrações das cepas probióticas nas rações foram de $3,72 \pm 1,88 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de *L. lactis*, $9,77 \pm 3,09 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de *P. pentosaceus*, $8,65 \pm 1,16 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de *E. hirae* e $6,95 \pm 1,86 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de *S. hominis*.

2.3 Condição experimental

Inicialmente, 520 juvenis de tambaqui com peso médio de $82,28 \pm 0,32$ g e comprimento total de $14,39 \pm 0,06$ cm, foram distribuídos aleatoriamente em 20 caixas experimentais com capacidade para 310 litros, divididos em cinco tratamentos (*L. lactis*, *P. pentosaceus*, *E. hirae*, *S. hominis* e controle), com quatro repetições cada, na densidade de 26 peixes/caixa, com aeração e renovação constante de água.

Durante o período experimental, as variáveis limnológicas (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade) foram monitoradas semanalmente utilizando sonda multiparâmetros Water Quality Meter (AK88) (Tabela 1) e encontravam-se dentro do recomendado para o conforto e bem estar dos peixes. Os animais foram alimentados três vezes ao dia (08h00; 12h45; 17h30) até a saciedade aparente, durante os 60 dias de experimento.

Tabela 1. Variáveis limnológicas nos grupos controle e suplementados com bactérias probióticas.

Tratamento	pH	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	Condutividade (μS cm ⁻¹)
Controle	7,5 ± 0,09	30,69 ± 0,41	3,56 ± 0,69	166,07 ± 0,53
<i>L. lactis</i>	7,54 ± 0,12	30,79 ± 0,41	3,94 ± 0,87	165,77 ± 0,72
<i>P. pentosaceus</i>	7,55 ± 0,09	30,68 ± 0,43	4,19 ± 0,74	166,04 ± 0,77
<i>E. hirae</i>	7,52 ± 0,10	30,7 ± 0,41	3,81 ± 0,72	165,63 ± 0,65
<i>S. hominis</i>	7,55 ± 0,10	30,73 ± 0,38	4,04 ± 0,88	165,83 ± 0,76

2.4 Parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos

Foram amostrados 60 peixes por coleta, sendo 12 peixes por tratamento, nos dias 0, 7, 15, 30, 45 e 60 de alimentação com as dietas experimentais.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos, os peixes foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L⁻¹) e o sangue colhido por punção do vaso caudal. O sangue total foi aliquoteado em tubos tipo eppendorf contendo 20 μL de heparina na concentração 100 UI mL⁻¹ para determinação do hemograma completo e, em tubos sem heparina, para obtenção do soro. Ainda, uma gota foi destinada à confecção de esfregaço sanguíneo.

No sangue total foi determinado o hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), concentração de hemoglobina (Collier, 1944) e contagem total de eritrócitos (RBC) (Ranzani-Paiva et al. 2013). Os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizados de acordo com Wintrobe (1934). A contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2006) e observadas em microscópio óptico comum.

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada seguindo metodologia descrita por Biller-Takahashi (2013), em que eppendorfs contendo 50 µL de nitroazul de tetrazolium (NBT) foi adicionado 50 µL de sangue. As amostras foram incubadas por 30 min no escuro em temperatura ambiente, 50 µL desta solução foi adicionada à 1 mL de N,N-dimetilformamida agitada e centrifugada, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm absorbância).

O restante do sangue total foi centrifugado (1500xg a 4°C durante 10 min) para separação do soro, o qual foi estocado a -80°C para posterior análise da concentração de proteína total, albumina, aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), todas estas anteriores seguindo recomendação do fabricante (Kit Labtest). Também foi realizado, atividade sérica da lisozima e atividade do sistema complemento (AHC50).

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Zanuzzo et al. (2017).

A atividade do sistema complemento (via alternativa) foi estimada de acordo com a metodologia descrita por Zanuzzo et al. (2015). Para tanto, 90 µl de cada amostra de soro mais 10 µl de tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ (ácido trietanolamina etilenoglicol tetracético, 8 mM, 2 mM de Mg²⁺ e 0,1% de gelatina) foram adicionados à 200 µl de solução contendo eritrócitos de coelho (2 x 10⁸ células por mL). A atividade foi transformada pela seguinte fórmula: ACH50 = 1 / *leitura da amostra* de acordo com Zanuzzo et al. (2017).

2.5 Histoquímica intestinal

No dia 60, após a colheita sanguínea, três peixes de cada caixa (12 por tratamento), foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L^{-1}) e os intestinos foram excisados por corte longitudinal de modo a manter as vilosidades expostas e fixados individualmente em solução de Bouin durante 24 h e desidratadas em série ascendente de álcool diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina, para obtenção de cortes histológicos semisseriados. As amostras foram divididas em três regiões (anterior, médio e posterior) e cortadas ($5 \mu\text{m}$ de espessura). Após a obtenção das lâminas, estas foram submetidas a reação de H&E (hematoxilina eosina) para análise estrutural das amostras e a reação de PAS (ácido periódico de Schiff) para a detecção de secreção de mucosubstâncias neutras pelas células caliciformes, também foi realizada a reação de PAS + AB pH 2,5 (Azul de Alcian) para a detecção de muco substâncias conjugadas (neutras + ácidas) pelas células caliciformes. A seguir, foram realizadas as reações de AB pH 2,5 e AB pH 0,5 para a detecção de secreção de mucosubstâncias ácidas carboxiladas e sulfatadas (Behmer et al., 1976).

2.6 Forma de análise dos resultados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software SigmaStat (versão 3.5). Os dados foram analisados através de two-way ANOVA. As médias foram comparadas com o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls, sendo consideradas diferenças significativas quando verificadas probabilidades inferiores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$).

Resultados

3.1 Análises hematológicas

A adição das cepas potenciais probióticas à ração na concentração 10^6 UFC g^{-1} não afetou os parâmetros hematológicos do tambaqui, sendo estatisticamente similares ($p > 0,05$) ao controle (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de alimentação com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis*.

Parâmetros hematológicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Hematócrito (%)	26,08 ± 1,17	25,83 ± 1,64	26,42 ± 1,00	27,08 ± 2,11	24,42 ± 1,81
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	5,96 ± 0,44	5,81 ± 0,32	5,98 ± 0,50	6,21 ± 0,53	5,66 ± 0,22
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,68 ± 0,11	1,74 ± 0,07	1,69 ± 0,14	1,74 ± 0,19	1,67 ± 0,05
VCM (fL)	155,84 ± 4,99	148,50 ± 10,69	157,22 ± 10,86	156,46 ± 6,17	148,35 ± 13,75
HCM (pg)	35,70 ± 0,73	33,36 ± 1,97	35,49 ± 0,36	35,84 ± 2,34	34,13 ± 2,42
CHCM (%)	22,91 ± 1,09	22,50 ± 1,32	22,64 ± 1,51	22,91 ± 0,81	23,34 ± 1,25
	7 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Hematócrito (%)	30,29 ± 1,51	29,04 ± 2,60	29,33 ± 1,98	31,08 ± 1,97	30,33 ± 0,47
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	5,79 ± 0,18	5,68 ± 0,24	5,53 ± 0,35	5,90 ± 0,19	5,78 ± 0,19
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,74 ± 0,08	1,63 ± 0,08	1,64 ± 0,08	1,78 ± 0,11	1,73 ± 0,06
VCM (fL)	173,71 ± 19,42	181,11 ± 3,11	175,89 ± 7,53	175,83 ± 10,36	177,94 ± 5,06
HCM (pg)	33,49 ± 2,26	34,92 ± 0,62	34,01 ± 1,45	33,35 ± 1,43	33,59 ± 1,17
CHCM (%)	19,20 ± 0,84	19,60 ± 0,93	18,97 ± 0,39	19,04 ± 0,81	19,04 ± 0,44
	15 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Hematócrito (%)	30,58 ± 1,48	30,92 ± 1,13	31,92 ± 1,85	31,50 ± 1,55	32,17 ± 1,04
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	6,26 ± 0,34	6,13 ± 0,16	6,20 ± 0,19	6,16 ± 0,26	6,28 ± 0,19
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,91 ± 0,19	1,91 ± 0,10	1,88 ± 0,11	1,89 ± 0,09	1,89 ± 0,04
VCM (fL)	161,37 ± 20,99	162,73 ± 10,07	169,79 ± 11,34	168,57 ± 14,21	170,67 ± 7,77
HCM (pg)	33,04 ± 2,83	32,34 ± 1,29	33,04 ± 1,52	32,89 ± 2,19	33,35 ± 1,24
CHCM (%)	20,46 ± 1,21	19,91 ± 0,54	19,51 ± 0,92	19,60 ± 0,83	19,55 ± 0,59
	30 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Hematócrito (%)	33,83 ± 1,97	32,33 ± 0,77	33,67 ± 2,46	32,04 ± 1,26	32,58 ± 3,07
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,00 ± 0,27	6,49 ± 0,35	6,81 ± 0,32	6,50 ± 0,13	6,60 ± 0,67
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,94 ± 0,12	1,79 ± 0,07	1,88 ± 0,15	1,86 ± 0,10	1,88 ± 0,19
VCM (fL)	175,96 ± 4,76	181,08 ± 8,73	180,34 ± 9,80	173,44 ± 9,77	173,29 ± 3,15
HCM (pg)	36,48 ± 1,22	36,27 ± 1,95	36,50 ± 1,63	35,14 ± 1,11	35,15 ± 1,25
CHCM (%)	20,71 ± 0,51	20,09 ± 0,92	20,29 ± 1,01	20,30 ± 0,71	20,28 ± 0,51
	45 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Hematócrito (%)	35,75 ± 3,52	33,83 ± 3,32	34,96 ± 2,93	36,00 ± 4,15	34,92 ± 1,87
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,29 ± 0,28	6,94 ± 0,50	7,07 ± 0,33	7,04 ± 0,43	7,13 ± 0,34
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	2,09 ± 0,08	2,03 ± 0,15	2,13 ± 0,09	1,96 ± 0,10	1,90 ± 0,17
VCM (fL)	171,45 ± 10,33	166,32 ± 9,46	165,17 ± 18,04	184,16 ± 13,16	185,21 ± 11,11
HCM (pg)	35,05 ± 2,39	34,32 ± 0,90	33,39 ± 1,91	36,02 ± 0,62	38,11 ± 2,75
CHCM (%)	20,62 ± 2,54	20,68 ± 0,70	20,32 ± 1,04	19,71 ± 1,52	20,69 ± 0,50
	60 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Hematócrito (%)	34,00 ± 0,72	34,92 ± 2,51	33,63 ± 0,75	34,50 ± 2,73	34,75 ± 0,32
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,28 ± 0,20	7,36 ± 0,41	7,28 ± 0,12	7,23 ± 0,31	7,56 ± 0,19
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	2,07 ± 0,07	2,14 ± 0,23	2,08 ± 0,14	2,04 ± 0,20	2,03 ± 0,16
VCM (fL)	165,30 ± 3,53	164,13 ± 10,19	163,03 ± 9,88	170,27 ± 6,08	173,70 ± 18,17
HCM (pg)	35,52 ± 1,75	34,64 ± 2,60	35,32 ± 2,18	35,87 ± 2,16	37,75 ± 4,34
CHCM (%)	21,48 ± 0,57	21,11 ± 0,49	21,66 ± 0,40	21,05 ± 0,85	21,82 ± 0,31

Tabela 3. Contagem total e diferencial dos leucócitos de *Colossoma macropomum* após 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de alimentação com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis*.

Parâmetros hematológicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	27,53 $\pm$ 10,95	33,54 $\pm$ 13,30	32,82 $\pm$ 12,64	35,08 $\pm$ 16,79	25,76 $\pm$ 13,64
Leucócitos (10^3 mm^{-3})	15,86 $\pm$ 5,86	17,62 $\pm$ 7,47	17,13 $\pm$ 6,44	14,44 $\pm$ 6,86	16,52 $\pm$ 6,07
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	13,23 $\pm$ 5,00	14,75 $\pm$ 6,21	14,15 $\pm$ 4,93	11,86 $\pm$ 6,48	13,00 $\pm$ 4,66
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	6,72 $\pm$ 3,91	8,57 $\pm$ 4,97	6,92 $\pm$ 3,30	7,61 $\pm$ 5,66	7,64 $\pm$ 4,09
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	14,82 $\pm$ 7,75	16,04 $\pm$ 14,20	19,25 $\pm$ 15,51	14,95 $\pm$ 8,03	24,18 $\pm$ 23,95
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	27,83 $\pm$ 21,29	29,41 $\pm$ 35,69	22,78 $\pm$ 21,20	25,62 $\pm$ 17,90	20,69 $\pm$ 25,45
Eosinófilos (mm^{-3})	14,41 $\pm$ 40,27	0	0	0	0
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	17,92 $\pm$ 24,40	11,52 $\pm$ 11,91	13,54 $\pm$ 16,99	6,73 $\pm$ 12,32	12,73 $\pm$ 10,87
7 dias					
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	21,01 $\pm$ 10,89	16,55 $\pm$ 8,51	21,10 $\pm$ 8,48	24,68 $\pm$ 11,92	25,20 $\pm$ 9,75
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	12,82 $\pm$ 3,86	10,65 $\pm$ 5,19	16,63 $\pm$ 6,61	14,16 $\pm$ 4,81	10,07 $\pm$ 3,80
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	9,03 $\pm$ 2,74	8,31 $\pm$ 4,72	12,91 $\pm$ 6,06	10,02 $\pm$ 4,70	7,16 $\pm$ 2,86
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	9,57 $\pm$ 4,19	6,63 $\pm$ 5,44	11,59 $\pm$ 5,17	12,81 $\pm$ 7,51	8,57 $\pm$ 4,80
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	26,40 $\pm$ 15,71	15,10 $\pm$ 8,22	22,36 $\pm$ 13,23	25,90 $\pm$ 18,11	17,98 $\pm$ 10,51
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	10,69 $\pm$ 11,39	12,34 $\pm$ 9,38	26,09 $\pm$ 28,18	19,29 $\pm$ 12,41	20,57 $\pm$ 20,27
Eosinófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	9,43 $\pm$ 12,03	4,09 $\pm$ 3,39	6,06 $\pm$ 10,36	7,58 $\pm$ 6,40	5,00 $\pm$ 7,57
15 dias					
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	22,30 $\pm$ 7,17	22,16 $\pm$ 11,27	22,12 $\pm$ 11,25	26,12 $\pm$ 11,61	24,39 $\pm$ 9,39
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	19,26 $\pm$ 8,22	17,13 $\pm$ 5,84	18,60 $\pm$ 7,57	21,80 $\pm$ 12,42	23,04 $\pm$ 8,99
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	15,69 $\pm$ 6,79	14,06 $\pm$ 5,30	15,28 $\pm$ 6,42	17,72 $\pm$ 11,81	17,90 $\pm$ 7,83
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	11,77 $\pm$ 6,22	8,19 $\pm$ 4,66	10,82 $\pm$ 5,51	12,71 $\pm$ 8,60	15,14 $\pm$ 7,18
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	20,84 $\pm$ 13,41	20,92 $\pm$ 8,12	19,09 $\pm$ 12,45	26,51 $\pm$ 17,37	32,53 $\pm$ 19,70
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	17,77 $\pm$ 22,88	7,48 $\pm$ 12,68	26,01 $\pm$ 35,60	7,74 $\pm$ 8,80	21,01 $\pm$ 28,71
Eosinófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	13,56 $\pm$ 19,97	8,39 $\pm$ 7,99	6,31 $\pm$ 12,63	8,21 $\pm$ 9,37	16,64 $\pm$ 16,70
30 dias					
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	32,83 $\pm$ 18,64	17,53 $\pm$ 7,83	27,89 $\pm$ 15,07	25,52 $\pm$ 8,45	24,19 $\pm$ 12,74
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	23,67 $\pm$ 6,12	19,52 $\pm$ 4,45	17,20 $\pm$ 3,81	20,88 $\pm$ 5,44	18,46 $\pm$ 7,76
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	18,78 $\pm$ 5,26	15,45 $\pm$ 3,80	12,66 $\pm$ 2,77	16,36 $\pm$ 4,26	13,10 $\pm$ 5,13
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	27,03 $\pm$ 11,43	18,49 $\pm$ 11,54	23,27 $\pm$ 8,62	21,42 $\pm$ 7,75	19,05 $\pm$ 11,01
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	17,99 $\pm$ 9,50	17,91 $\pm$ 7,47	17,97 $\pm$ 9,35	19,62 $\pm$ 10,90	29,96 $\pm$ 22,54
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	14,24 $\pm$ 16,59	16,40 $\pm$ 12,26	10,06 $\pm$ 18,31	17,57 $\pm$ 19,35	12,92 $\pm$ 11,41
Eosinófilos (mm^{-3})	0	0	0	32,83 $\pm$ 80,01	0
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	24,62 $\pm$ 21,08	25,83 $\pm$ 18,63	31,10 $\pm$ 21,82	20,93 $\pm$ 17,48	32,73 $\pm$ 31,19

	45 dias				
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	30,52 $\pm$ 11,83	34,45 $\pm$ 17,39	28,21 $\pm$ 9,94	25,06 $\pm$ 11,53	22,21 $\pm$ 9,64
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	17,62 $\pm$ 5,68	15,78 $\pm$ 6,03	20,42 $\pm$ 7,10	19,79 $\pm$ 5,55	17,56 $\pm$ 4,46
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	13,73 $\pm$ 4,91	12,48 $\pm$ 5,59	16,69 $\pm$ 6,14	15,47 $\pm$ 4,63	13,63 $\pm$ 4,41
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	15,38 $\pm$ 8,24	13,19 $\pm$ 8,69	14,92 $\pm$ 6,92	16,27 $\pm$ 6,35	14,66 $\pm$ 6,93
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	20,45 $\pm$ 14,05	16,97 $\pm$ 7,62	17,36 $\pm$ 6,45	24,16 $\pm$ 18,85	21,49 $\pm$ 11,72
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	8,51 $\pm$ 11,86	10,31 $\pm$ 11,99	12,72 $\pm$ 18,49	7,60 $\pm$ 10,47	15,61 $\pm$ 22,62
Eosinófilos (mm^{-3})	5,79 $\pm$ 20,07	28,18 $\pm$ 52,79	0	21,53 $\pm$ 50,86	0
Basófilos (mm^{-3})	8,14 $\pm$ 28,22	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	21,25 $\pm$ 12,82	15,15 $\pm$ 15,19	36,49 $\pm$ 24,70	17,68 $\pm$ 19,44	15,82 $\pm$ 11,96
	60 dias				
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	24,57 $\pm$ 9,70	29,95 $\pm$ 14,98	20,43 $\pm$ 12,37	21,58 $\pm$ 12,67	27,92 $\pm$ 14,32
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	24,36 $\pm$ 7,34	21,46 $\pm$ 6,36	28,06 $\pm$ 5,49	23,81 $\pm$ 7,15	20,94 $\pm$ 6,45
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	19,64 $\pm$ 6,59	17,44 $\pm$ 5,29	23,40 $\pm$ 4,69	19,18 $\pm$ 6,35	16,57 $\pm$ 4,94
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	20,00 $\pm$ 8,41	17,55 $\pm$ 6,43	20,09 $\pm$ 9,78	18,26 $\pm$ 6,00	16,78 $\pm$ 9,22
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	23,91 $\pm$ 8,97	18,56 $\pm$ 14,83	20,42 $\pm$ 15,87	23,02 $\pm$ 17,78	22,70 $\pm$ 14,88
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	10,44 $\pm$ 16,11	19,77 $\pm$ 17,37	31,92 $\pm$ 24,54	23,49 $\pm$ 34,93	9,14 $\pm$ 11,79
Eosinófilos (mm^{-3})	12,58 $\pm$ 30,32	0	25,15 $\pm$ 56,00	13,30 $\pm$ 46,09	5,41 $\pm$ 18,76
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	21,65 $\pm$ 23,29	20,42 $\pm$ 11,15	26,45 $\pm$ 18,16	25,02 $\pm$ 29,71	33,01 $\pm$ 27,65

3.2 Análises bioquímicas

A proteína total, albumina, globulina e albumina:globulina não foram alteradas após alimentação por 60 dias com as dietas contendo as bactérias probióticas, sendo estatisticamente similares ($p > 0,05$) ao controle (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de *Colossoma macropomum* após 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de alimentação com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis*.

	0 dias				
Parâmetros bioquímicos	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Proteína (g dL ⁻¹)	4,12 $\pm$ 0,46	4,08 $\pm$ 0,29	3,88 $\pm$ 0,38	4,15 $\pm$ 0,41	3,92 $\pm$ 0,16
Albumina (g dL ⁻¹)	0,59 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,08	0,60 $\pm$ 0,04
Globulina (g dL ⁻¹)	3,53 $\pm$ 0,42	3,49 $\pm$ 0,26	3,28 $\pm$ 0,36	3,54 $\pm$ 0,33	3,32 $\pm$ 0,12
A:G (g dL ⁻¹)	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,00
	7 dias				
Proteína (g dL ⁻¹)	4,11 $\pm$ 0,14	4,17 $\pm$ 0,38	3,88 $\pm$ 0,10	4,08 $\pm$ 0,19	3,88 $\pm$ 0,12
Albumina (g dL ⁻¹)	0,69 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,11	0,69 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,14
Globulina (g dL ⁻¹)	3,42 $\pm$ 0,16	3,36 $\pm$ 0,42	3,19 $\pm$ 0,05	3,37 $\pm$ 0,17	3,13 $\pm$ 0,12
A:G (g dL ⁻¹)	0,20 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,06
	15 dias				

Proteína (g dL ⁻¹)	4,01 ± 0,26	3,96 ± 0,20	4,12 ± 0,15	4,11 ± 0,17	4,33 ± 0,13
Albumina (g dL ⁻¹)	0,61 ± 0,05	0,58 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,65 ± 0,03
Globulina (g dL ⁻¹)	3,40 ± 0,24	3,38 ± 0,17	3,48 ± 0,15	3,47 ± 0,17	3,69 ± 0,15
A:G (g dL ⁻¹)	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01
30 dias					
Proteína (g dL ⁻¹)	4,46 ± 0,15	4,05 ± 0,11	4,27 ± 0,33	4,24 ± 0,11	4,23 ± 0,29
Albumina (g dL ⁻¹)	0,61 ± 0,06	0,57 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,60 ± 0,04	0,63 ± 0,03
Globulina (g dL ⁻¹)	3,86 ± 0,12	3,48 ± 0,14	3,65 ± 0,29	3,65 ± 0,10	3,60 ± 0,29
A:G (g dL ⁻¹)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,02
45 dias					
Proteína (g dL ⁻¹)	4,46 ± 0,44	4,38 ± 0,15	4,37 ± 0,22	4,40 ± 0,30	4,35 ± 0,31
Albumina (g dL ⁻¹)	0,65 ± 0,03	0,67 ± 0,05	0,66 ± 0,01	0,68 ± 0,06	0,68 ± 0,05
Globulina (g dL ⁻¹)	3,81 ± 0,42	3,71 ± 0,14	3,71 ± 0,23	3,72 ± 0,25	3,66 ± 0,28
A:G (g dL ⁻¹)	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01
60 dias					
Proteína (g dL ⁻¹)	4,24 ± 0,19	4,39 ± 0,28	4,42 ± 0,46	4,38 ± 0,13	4,39 ± 0,20
Albumina (g dL ⁻¹)	0,68 ± 0,05	0,75 ± 0,06	0,69 ± 0,02	0,73 ± 0,08	0,71 ± 0,01
Globulina (g dL ⁻¹)	3,56 ± 0,22	3,64 ± 0,29	3,73 ± 0,44	3,65 ± 0,08	3,67 ± 0,19
A:G (g dL ⁻¹)	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,01

Albumina:Globulina (A:G)

A alanina aminotransferase (ALT) mostrou diferença entre os tratamentos no dia 7 (Figura 1), apresentando valores maiores nos peixes alimentados com ração suplementada com as cepas de *P. pentosaceus*, *E. hirae* e *S. hominis* ($p < 0,05$).

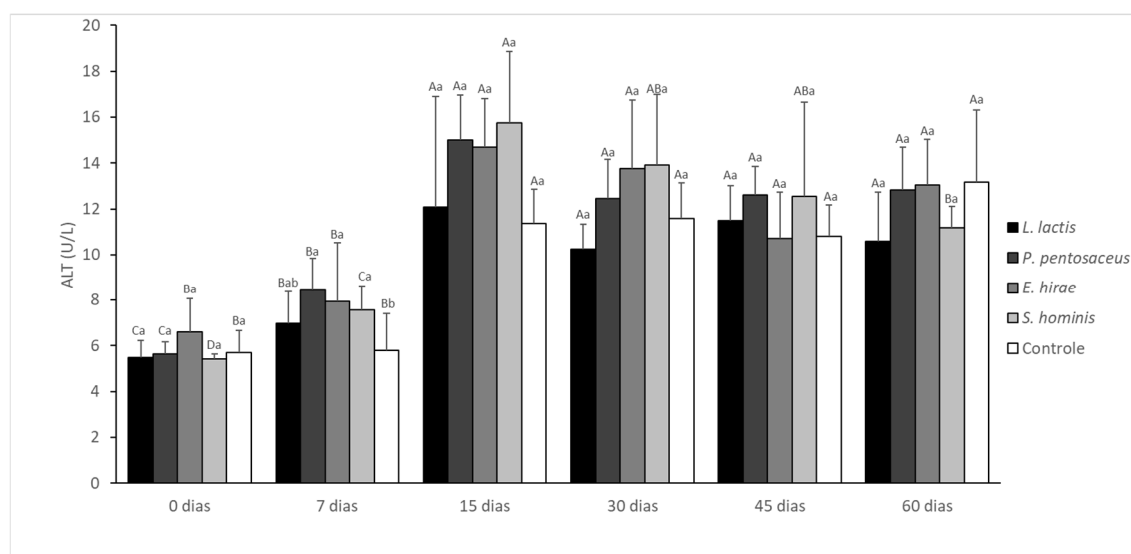


Figura 1. Valores médios e desvio padrão de alanina aminotransferase (UI L⁻¹) de *Colossoma macropomum* alimentados com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis* em diferentes tempos de coleta (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de coleta para o mesmo probiótico e letras minúsculas indicam diferença significativa entre os diferentes probióticos testados no mesmo tempo de alimentação e coleta ($p < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Para a enzima aspartato aminotransferase (AST), apenas a cepas *S. hominis* diferiu do grupo controle e dos demais tratamentos no dia 15 (Figura 2) e a cepa *P. pentosaceus* diferiu dos demais tratamentos no dia 30 após a alimentação.

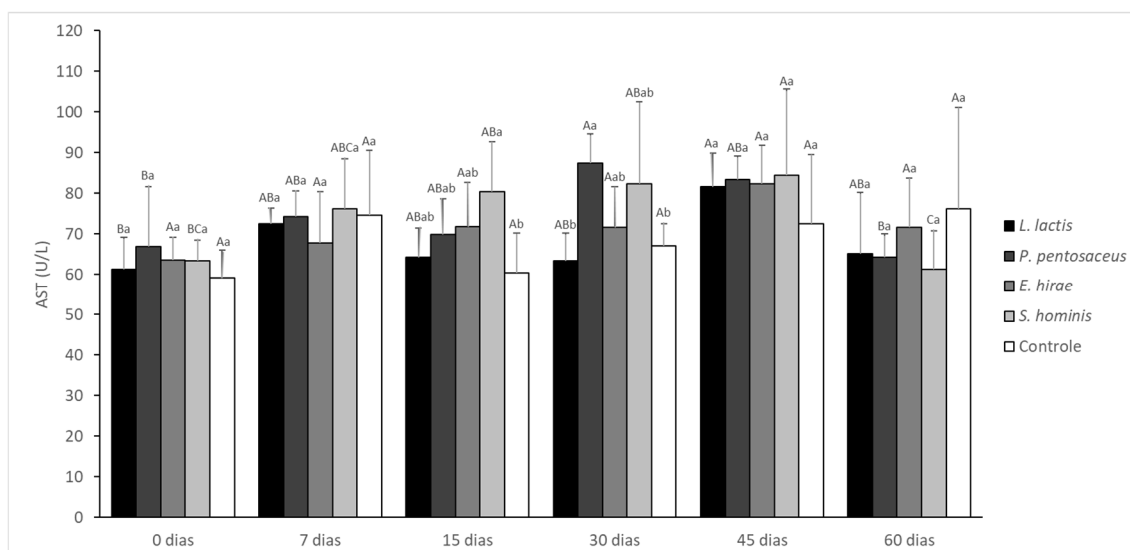


Figura 2. Valores médios e desvio padrão de aspartato aminotransferase (UI L⁻¹) de *Colossoma macropomum* alimentados com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis* em diferentes tempos de coleta (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os diferentes tempos de coleta para o mesmo probiótico e letras minúsculas indicam diferença significativa entre os diferentes probióticos testados no mesmo tempo de alimentação e coleta ($p < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

3.3 Análises imunológicas

A atividade respiratória dos leucócitos (Figura 3) foi maior nos peixes alimentados com ração suplementada com *L. lactis* e *P. pentosaceus* no dia 60 ($p < 0,05$). O complemento e a lisozima não foram alterados após alimentação por 60 dias com as dietas contendo as bactérias probióticas ($p > 0,05$) (Tabela 5).

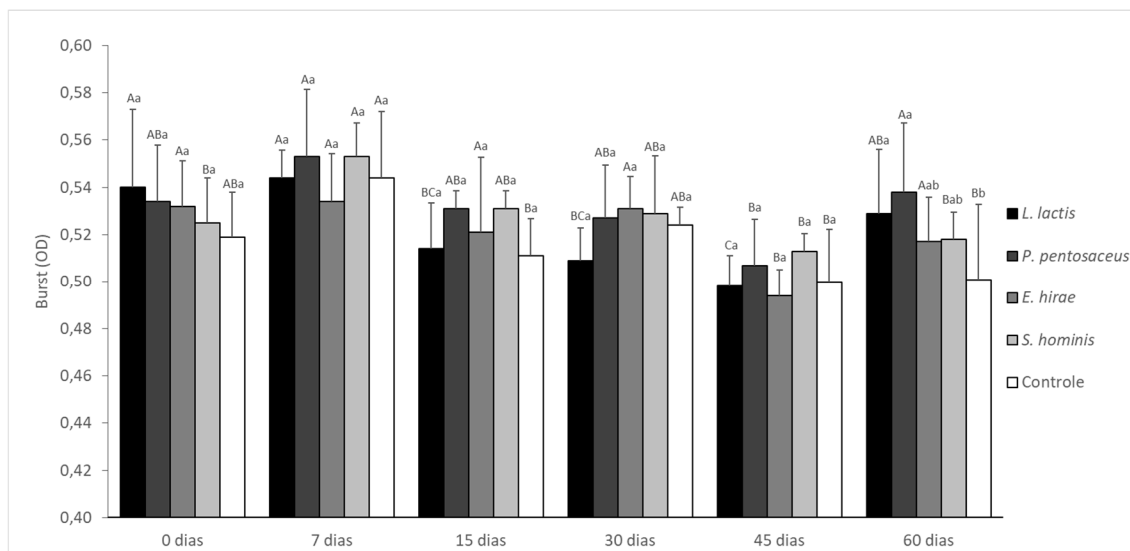


Figura 3. Valores médios e desvio padrão da atividade respiratória dos leucócitos (OD) de *Colossoma macropomum* alimentados com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis* em diferentes tempos de coleta (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de coleta para o mesmo probiótico e letras minúsculas indicam diferença significativa entre os diferentes probióticos testados no mesmo tempo de alimentação e coleta ($p < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 5. Parâmetros imunológicos de *Colossoma macropomum* após 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de alimentação com dieta suplementada com Controle, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis*.

Parâmetros imunológicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Complemento ($\times 10^1$ min)	24,43 $\pm$ 10,09	28,39 $\pm$ 32,84	20,76 $\pm$ 13,77	16,12 $\pm$ 6,79	21,48 $\pm$ 11,93
Lisozima ($\times 10^2$ ng μL^{-1})	9,58 $\pm$ 0,54	8,79 $\pm$ 1,10	10,04 $\pm$ 3,05	14,12 $\pm$ 7,71	12,72 $\pm$ 5,34
	7 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>S. hominis</i>
Complemento ($\times 10^1$ min)	27,34 $\pm$ 39,88	6,32 $\pm$ 6,14	5,47 $\pm$ 0,70	3,52 $\pm$ 0,79	5,11 $\pm$ 4,05
Lisozima ($\times 10^2$ ng μL^{-1})	8,40 $\pm$ 1,09	9,54 $\pm$ 1,66	8,46 $\pm$ 0,24	9,58 $\pm$ 0,96	9,08 $\pm$ 0,82

	15 dias				
Complemento ($\times 10^1$ min)	$2,80 \pm 3,91$	$15,66 \pm 30,58$	$21,53 \pm 30,46$	$5,30 \pm 6,71$	$11,20 \pm 11,82$
Lisozima ($\times 10^2$ ng μL^{-1})	$8,69 \pm 0,82$	$9,64 \pm 2,55$	$9,94 \pm 1,28$	$8,40 \pm 1,09$	$9,73 \pm 0,82$
	30 dias				
Complemento ($\times 10^1$ min)	$14,19 \pm 15,08$	$9,24 \pm 6,56$	$15,63 \pm 16,57$	$17,95 \pm 18,71$	$23,90 \pm 28,47$
Lisozima ($\times 10^2$ ng μL^{-1})	$12,43 \pm 5,51$	$10,17 \pm 0,64$	$8,50 \pm 1,21$	$9,70 \pm 1,29$	$14,24 \pm 5,93$
	45 dias				
Complemento ($\times 10^1$ min)	$5,66 \pm 4,43$	$2,23 \pm 0,77$	$10,98 \pm 12,94$	$3,38 \pm 3,12$	$4,79 \pm 3,31$
Lisozima ($\times 10^2$ ng μL^{-1})	$9,55 \pm 0,63$	$9,56 \pm 0,76$	$13,72 \pm 9,14$	$12,15 \pm 4,71$	$9,21 \pm 1,34$
	60 dias				
Complemento ($\times 10^1$ min)	$17,41 \pm 32,04$	$3,03 \pm 3,35$	$1,79 \pm 1,65$	$2,83 \pm 3,47$	$2,18 \pm 1,42$
Lisozima ($\times 10^2$ ng μL^{-1})	$12,18 \pm 4,17$	$8,75 \pm 0,69$	$16,17 \pm 6,07$	$10,60 \pm 1,53$	$10,77 \pm 2,35$

3.4 Análise da histoquímica intestinal

A reação de H&E (Figura 4), demonstrou que o intestino anterior do grupo controle estava organizado histologicamente por duas camadas musculares, sendo uma circular externa e uma longitudinal interna. Após a camada muscular, encontrava-se a submucosa, formada por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos. Acima da submucosa, a formação mucosa formada por um epitélio prismático/columnar simples com a presença de células caliciformes. A área absorptiva apresentava uma densa camada de muco, dando origem a borda em escova. O intestino médio do controle apresentou organização histológica similar ao anterior, porém, com maior número de vilosidades intestinais. O intestino posterior apresentou organização similar aos anteriores, com maior espaçamento entre as vilosidades intestinais.

O intestino anterior, médio e posterior dos peixes alimentados com dieta contendo *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus hominis* apresentaram organização histológica similar ao controle. O intestino anterior, médio e posterior dos peixes alimentados com dieta contendo *Enterococcus hirae* apresentaram organização histológica similar ao controle, porém, com maior quantidade de células caliciformes nas três porções em alguns animais.

Na reação de PAS (Figura 5), as vilosidades do intestino inicial, médio e final, do tratamento controle, apresentaram entre as células do epitélio absorptivo, células caliciformes secretoras de mucosubstâncias neutras que auxiliam na formação da borda em escova protetora da região absorptiva dos enterócitos. Na região inicial e final

a quantidade relativa de células caliciformes foi menor, quando comparada a região média, sendo assim, ocorreu maior secreção de mucosubstâncias neutras nesta região. A região de sustentação do tecido epitelial absortivo apresentou baixa intensidade de reação ao PAS.

A presença de *Lactococcus lactis* causou diminuição da intensidade de secreção de muco substâncias neutras pelas células caliciformes na região inicial do intestino e aumento da presença de células caliciformes e da intensidade de secreção na região final. No tratamento com *Pediococcus pentosaceus* ocorreu diminuição das células caliciformes na região inicial e média, com diminuição da intensidade de secreção de mucosubstâncias neutras nestas regiões. No tratamento com *Enterococcus hirae*, ocorreu diminuição das células caliciformes na região inicial e média e aumento na região final. No tratamento com *Staphylococcus hominis* ocorreu diminuição das células caliciformes e do seu conteúdo de secreção em todas as regiões do intestino e diminuição da intensidade de reação na borda em escova em relação ao controle.

A reação PAS + AB pH 2,5 (Figura 6), no tratamento controle demonstrou que as células caliciformes das três regiões do intestino secretaram mucosubstâncias neutras e ácidas (conjugadas), entretanto o padrão da borda em escova é mais neutro (reação do PAS isolado), com menor presença de mucosubstâncias conjugadas. No tratamento com *Lactococcus lactis* ocorreu menor presença de células caliciformes secretoras de mucosubstâncias conjugadas em relação ao controle, porém o padrão destas na borda em escova foi similar. O padrão de diminuição de células caliciformes secretoras de mucosubstâncias conjugadas também ocorreu nos tratamentos com *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis*.

Na avaliação de secreção de mucosubstâncias carboxiladas não ocorreu alteração no padrão entre os grupos controle e tratados, o que indica que a presença das bactérias estudadas não interferiu neste processo de secreção celular de proteção do epitélio absortivo. Na avaliação de secreção de mucosubstâncias sulfatadas não houve reação em nenhum tratamento.

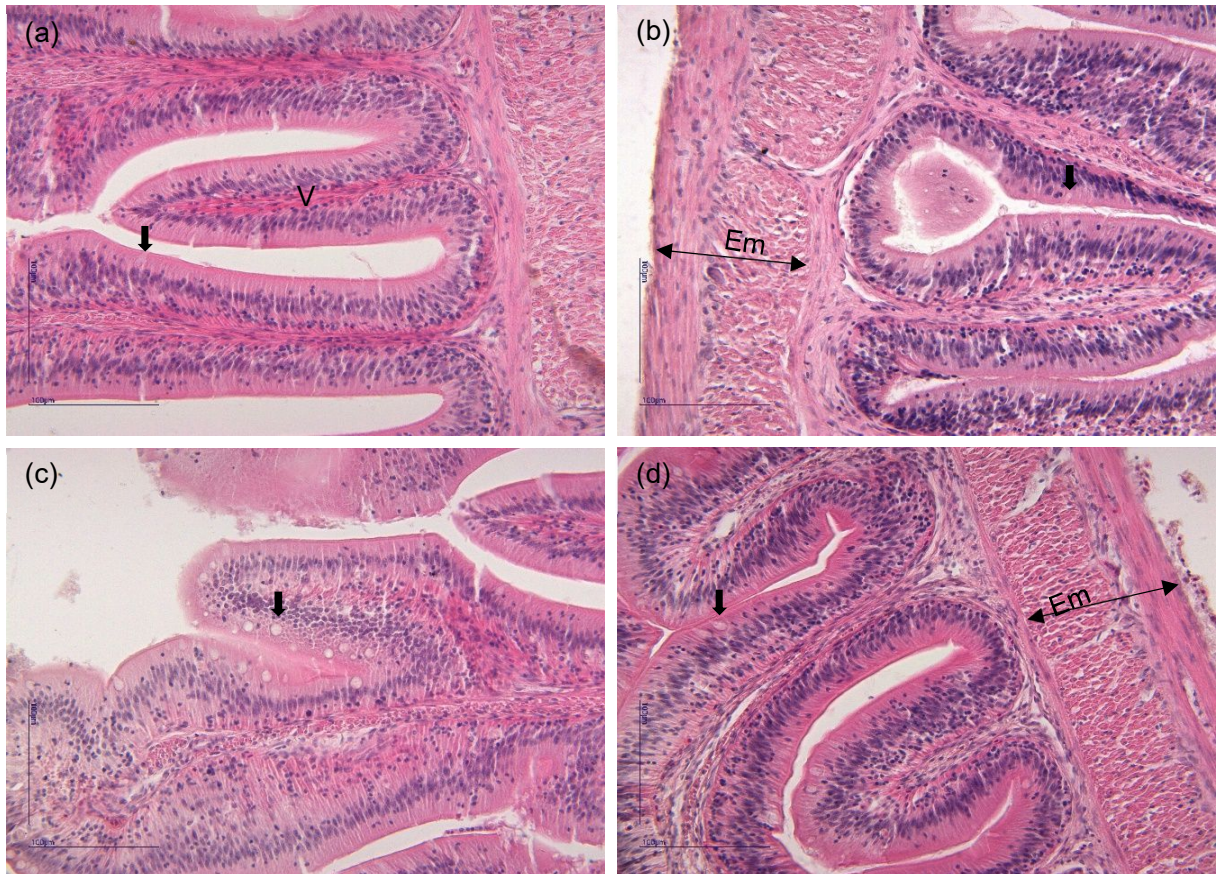


Figura 4. Histologia intestinal de *Colossoma macropomum* coradas com H&E, (a) e (b) segmentos anterior e médio respectivamente de animais alimentados com dieta controle, (c) e (d) segmentos anterior e médio de tambaquis alimentados com dieta contendo 10^6 UFC g⁻¹ de *Enterococcus hirae*. (V) vilosidade, (Em) espessura muscular, (seta) célula caliciforme.

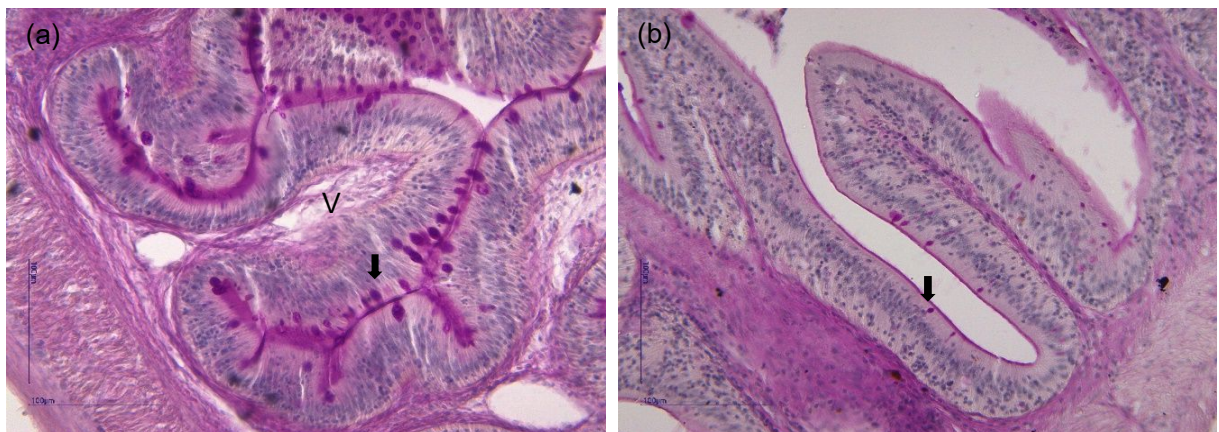


Figura 5. Histologia intestinal de *Colossoma macropomum* coradas com PAS, (a) segmento médio de animal alimentado com dieta controle e (b) segmento anterior de animal alimentado com dieta contendo 10^6 UFC g⁻¹ de *Enterococcus hirae*. (V) vilosidade, (seta) célula caliciforme secretora de mucosubstâncias neutras.

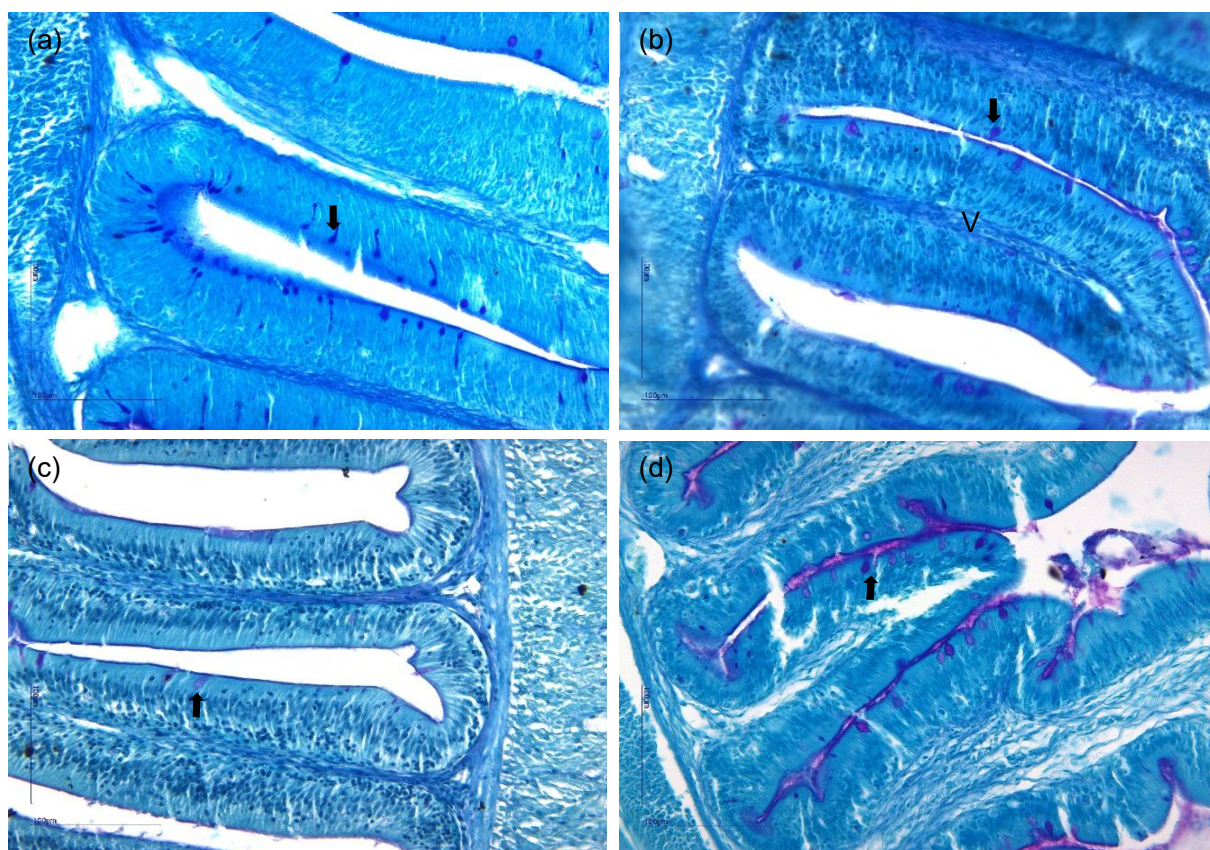


Figura 6. Histologia intestinal de *Colossoma macropomum* coradas com PAS + AB pH 2,5, (a) segmento anterior de animal alimentado com dieta controle e (b) segmento anterior de animal alimentado com dieta contendo 10^6 UFC g^{-1} de *Lactococcus lactis*, (c) segmento médio de animal alimentado com dieta contendo 10^6 UFC g^{-1} de *Pediococcus pentosaceus*, (d) segmento posterior de animal alimentado com dieta contendo 10^6 UFC g^{-1} de *Staphylococcus hominis*. (V) vilosidade, (seta) célula caliciforme secretora de mucosubstâncias conjugadas.

4 Discussão

A maioria dos artigos da literatura encontraram alguns efeitos positivos dos probióticos em várias espécies de peixes, principalmente no crescimento, na resistência às doenças, na microbiota intestinal ou no incremento dos parâmetros imunológicos (Martínez Cruz et al., 2012; Tuan et al., 2013).

Enquanto o uso de probióticos tem sido extensivamente estudado em tilápia (Tan et al., 2019; Cavalcante et al., 2020; Dawood et al., 2020; Xia et al., 2020; Maas et al., 2021), com o tambaqui é o contrário, poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre os benefícios do seu uso nesta espécie tão importante para a aquicultura sul americana.

A microbiota intestinal é muito importante para o crescimento, desenvolvimento e saúde dos peixes, pois ela auxilia na regulação do sistema imune, contribuindo para a manutenção da saúde (Nayak, 2010).

Uma das principais formas de manipular a composição da microbiota intestinal dos peixes é através do fornecimento de bactérias probióticas, especialmente autóctones na dieta, pois elas têm demonstrado aumentar o desempenho produtivo, melhorar a nutrição, aumentar a sobrevivência e a resistência às doenças de várias espécies de peixes.

A composição da microbiota intestinal é espécie-específica e depende da anatomia da espécie, da secreção de enzimas digestivas, pH, osmolaridade, potencial redox, tamanho e estrutura do trato gastrointestinal, velocidade de passagem e tempo de residência (Merrifield & Ringø, 2014). Além da fisiologia da espécie, a composição microbiana também depende de fatores ambientais, como a temperatura da água, salinidade e alterações no ambiente (elevada concentração de matéria orgânica) e a dieta fornecida (Giatsis et al., 2014; Merrifield & Ringø, 2014).

A grande maioria das bactérias probióticas estudadas são as ácido-láticas (Tuan et al., 2013). Bactérias probióticas autóctones (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) são muito mais eficientes que as bactérias alóctones em colonizar o intestino de seus hospedeiros e tem sido utilizadas com o objetivo de incrementar o desempenho produtivo, os parâmetros hematológicos e imunológicos, bem como modificar a microbiota intestinal de muitas espécies de peixes, tanto de produção como ornamentais (Park et al., 2017; Jatoba et al., 2018; Liu et al., 2018; Dias et al., 2018; Paixão et al., 2020).

Todavia, em peixes nativos sul americanos a realidade não é a mesma. Até o momento, apenas cepas do gênero *Bacillus* foram utilizadas como probiótico para o tambaqui por produzir compostos antimicrobianos e por sua capacidade de esporulação, que permite sua sobrevivência em diferentes ambientes. Dentre as cepas utilizadas destacam-se o *B. subtilis* (Santos et al., 2021; Paixão et al., 2017; Azevedo et al., 2016), um mix de *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. pumilus* (Ferreira et al., 2014) todos alóctones e *B. cereus* (Dias et al., 2018), a única bactéria probiótica autóctone.

Neste trabalho foram utilizadas quatro cepas autóctones (*Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus hominis*) previamente isoladas e caracterizadas *in vitro* com potencial probiótico (Kotzent et al., 2021), sendo este o primeiro estudo com essas bactérias ácido lácticas no tambaqui. Essas bactérias foram liofilizadas e adicionadas à ração na concentração de 10^6 UFC g⁻¹ e administradas durante 60 dias para tambaquis.

Ferramentas hematológicas e bioquímicas são excelentes para descrever a condição de saúde e os aspectos nutricionais de um animal e elas podem ser beneficiadas com o uso de probióticos administrados na dieta por um período curto ou longo (Nandi et al., 2017; Valiollahi et al., 2018; Paixão et al., 2020). Com relação aos resultados da adição das quatro diferentes cepas probióticas (*E. hirae*, *L. lactis*, *P. pentosaceus* e *S. hominis*) na ração do tambaqui, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM), bioquímicos (proteína, albumina e globulina) e imunológicos (lisozima e complemento), nos diferentes tratamentos em nenhum dos tempos de coleta, 0, 7, 15, 30, 45 e 60 como relatado em trabalhos da literatura com o uso de bactéria autóctones para várias espécies de peixes (Ayyat et al., 2014; Paixão et al., 2020; Tachibana et al., 2020; Haque et al., 2021).

Possivelmente esses resultados indicam que os tambaquis estavam saudáveis, em condição de bem estar, com todas as variáveis limnológicas adequadas e recebendo uma dieta nutricionalmente correta que não permitiram que as bactérias com potencial probiótico modulassem sua microbiota intestinal e com isso, não houve alteração da fisiologia como esperado. Possivelmente, em condições de estresse, em que há quebra da homeostase, como ocorre em condições de criação, quando há oscilação térmica diária, manejo constante e intenso e qualidade de água muitas vezes inadequada (Assane et al., 2021), as bactérias probióticas, que promoveram um excelente resultado *in vitro* poderiam beneficiar a saúde do tambaqui.

A eficácia dos probióticos depende da espécie probiótica, da concentração administrada, do período de alimentação e também da composição genética da bactéria e do hospedeiro (Banerjee e Ray, 2017).

Assim, outro fator que pode ter contribuído para a ausência de diferença nos parâmetros analisados dos tambaquis alimentados com ração suplementada com as bactérias probióticas foi a duração da suplementação, que neste estudo foi de 60 dias.

Como este foi o primeiro estudo com essas quatro bactérias ácido lácticas para o tambaqui, não sabíamos qual o tempo necessário de administração para obtermos resposta positiva, principalmente relacionada à saúde do tambaqui. Desta forma, tempos diferentes de administração devem ser testados para a espécie, bem como novos protocolos, como o de alimentação pulsada. Há uma diversidade de estudos com dose e tempo de administração de probióticos diferentes para várias espécies de peixes e com resultados distintos. Ahmadifar et al. (2020) alimentaram carpas comum com uma cepa de *P. pentosaceus* em diferentes concentrações durante 45 dias e observaram melhora em alguns parâmetros hematológicos como hematócrito, eritrócitos, leucócitos e hemoglobina.

Dias et al. (2018) ao alimentarem tambaquis com *Bacillus cereus* durante 120 dias observaram efeitos positivos na fisiologia dos peixes após 90-120 dias, com aumento na concentração de glicose em decorrência do aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes da ração, interferindo no metabolismo glicêmico, aumento de proteína plasmática, hematócrito, eritrócitos, trombócitos e neutrófilos.

Tachibana et al. (2020) suplementaram a dieta da tilápia-do-Nilo com a bactéria probiótica *Enterococcus faecium* e testaram diferentes regimes de alimentação (alimentação continua somente com dieta comercial sem probiótico, alimentação continua com ração suplementada com *Enterococcus faecium*, administração pulsada de 7 e 14 dias, alternando dieta com e sem o *Enterococcus faecium*) e observaram que a suplementação com *Enterococcus faecium* aumentou o crescimento, incrementou o sistema imune e com isso, aumentou a resistência dos peixes à bactéria *Aeromonas hydrophila* quando administrada durante 14 dias.

Paixão et al. (2020) alimentaram *Amphiprion ocellaris* com uma bactéria probiótica autóctone (*Lactobacillus plantarum*) durante 90 dias e observaram aumento na quantidade de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e leucócitos (linfócitos e monócitos), concluindo que a alimentação com *Lactobacillus plantarum* incrementa o desempenho produtivo e a resistência contra patógenos em *Amphiprion ocellaris*.

Devido à escassez de dados sobre o tambaqui, estudos sobre a caracterização do microbioma intestinal da espécie e do mecanismo de ação de bactérias probióticas em diferentes situações fisiológicas serão necessários para se estabelecer protocolos de administração de probióticos e seu efeito na saúde e desempenho produtivo dos peixes. Desta forma, conseguiremos fazer a gestão da saúde desta importante espécie nativa, que hoje é um dos objetivos principais da aquicultura, que é produzir peixes de excelência, com o máximo rendimento e principalmente, de alta qualidade para consumo humano.

5 Referências

Abreu, J.S., Marzocchi-Machado, C.M., Urbaczek, A.C., Fonseca, L.M., Urbinati, E.C., 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) Braz. J. Biol. 69 (4), 1133-1139. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000500018>.

Ahmadifar, E., Sadegh, T. H., Dawood, M. A. O., Dadar, M., Sheikhzadeh, N., 2020. The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture. 516, 734656. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734656>.

Assane, I.M., Santos-Filho, N.A., Sousa, E.L., Brasil, M.C.O.A., Cilli, E.M., Pilarski, F., 2021. Cytotoxicity and antimicrobial activity of synthetic peptides alone or in combination with conventional antimicrobials against fish pathogenic bacteria. J. Appl. Microbiol. <https://doi.org/10.1111/jam.15080>.

Ayyat, M. S., Labib, H. M., Mahmoud, H. K., 2014. A Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Appl Aquaculture. 26, 208-215. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.934164>.

Azevedo, R. V., Fosse Filho, J. C., Pereira, S. L., Cardoso, L. D., Vidal Júnior, M. V., Andrade, D. R., 2016. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. Pesqui. Agropecu. Bras. 51, 9-16. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000100002>.

Banerjee, G., Ray, A. K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Res. Vet. Sci. 115, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>.

Behmer, A.O., Talosa, C.M.E. and Neto, F.G.A., 1976. Manual De Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. EDART. Edit.

Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Saita, M.V., Gimbo, R.Y., Urbinati, E.C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz. J. Biol.* 73 (2), 425-429. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>.

Cavalcante, R.B., Telli, G.S., Tachibana, L., Dias, D.C., Oshiro, E., Natori, M.M., Silva, W.F.S., Ranzani-Paiva, M.J., 2020. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquacult Rep. Aquaculture Reports*. 17, 100343. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100343>.

Chen, S.W., Liu, C.H., Hu, S.Y., 2019. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 84, 695-703. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.059>.

Collier, H.B., 1944. The standardization of blood hemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.* 50 (6), 550-552.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M., Van Doan, H., 2018. Probiotic application for sustainable aquaculture. *Rev. Aquac.* 11(3), 907-924. <https://doi.org/10.1111/raq.12272>.

Dawood, M. A. O., Eweedah, N. M., Moustafa, E. M., Farahat, E. M., 2020. Probiotic effects of *Aspergillus oryzae* on the oxidative status, heat shock protein, and immune related gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under hypoxia challenge. *Aquaculture*. 520, 734669. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734669>.

Dias, J.A.R., Abe, H.A., Sousa, N.C., Couto, M.V.S., Cordeiro, C.A.M., Meneses, J.O., Cunha, F.S., Mouriño J.L.P., Martins M.L., Barbas, L.A.L., Carneiro, P.C.F., Maria, A.N., Fujimoto, R.Y., 2018. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.* 49, 3063-3070. <https://doi.org/10.1111/are.13767>.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays. In: Stolen J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., Muiswinkel, W. B., (eds) *Techniques in fish immunology*. Sos Publications, 101-103.

Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., Toropilová, J., 2017. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*. 469, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>.

Ferreira, C. M., Antoniassi, N. A. B., Silva, F. G., Povh, J. A., Potência, A., Moraes, T. C. H., Silva, T. K. S. T., Abreu, J. S., 2014. Características histomorfométricas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. *Pesq. Vet. Bras.* 34, 1258-1264. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200020>.

Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Assane, I.M., Alves, L.O., Kotzent, S., Hashimoto, D.T., Pilarski F., 2020. Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. *Microb. Pathog.* 149, 104512. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512>.

Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Verreth, J., Verdegem, M., 2014. The colonisation dynamics of the gut microbiota in tilapia larvae. *Plos one*, 9, e103641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103641>.

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *Am. J. Clin. Pathol.* 56 (1), 35-39. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>.

Haque, M. M., Hasan, N. A., Mahmoud M., Eltholth, M. M., Saha, P., Mely, S. S., Rahman, T., Murray, F. J., 2021. Assessing the impacts of in-feed probiotic on the growth performance and health condition of pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) in a farm trial. *Aquacult Rep.* 20, 100699. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100699>.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020) Produção da aquicultura. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21>)

Jatobá, A., Moraes, K. N., Rodrigues, E. F., Vieira, L. M., Pereira, M. O., 2018. Frequency in the supply of *Lactobacillus* influence its probiotic effect for yellow tail lambari. *Cienc. Rural.* 48. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180042>.

Kotzent, S., Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Alves, L.O., Pilarski, F., 2021. Probiotic potential of autochthonous bacteria from tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.* 52(5), 2266-2275. <https://doi.org/10.1111/are.15078>.

Liu, C. H., Wu, K., Chu, T. W., Wu, T. M., 2018. Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance

against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Aquacult Int. 26, 63-74. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0189-z>

Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Debnath, S., Marchal, L., Schrama, J.W., 2021. Effect of enzymes (phytase and xylanase), probiotics (*B. amyloliquefaciens*) and their combination on growth performance and nutrient utilisation in Nile tilapia. Aquaculture. 533, 736226. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736226>.

Martinez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Hermosillo, O. A. M., Saad, H. C. R., 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. International Scholarly Research Network. 2012, 13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>.

Merrifield, D., Ringø, E., 2014. Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics.

Nandi, A., Banerjee, G., Dan, S. K., Ghosh, K., Ray, A. K., 2017. Probiotic efficiency of *Bacillus* sp. in *Labeo rohita* challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. Aquac. Res. 48, 4334-4345. <https://doi.org/10.1111/are.13255>.

Nayak, S. K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish Shellfish Immunol. 29, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.

Paixão, A. E. M., Santos, J. C., Pinto, M. S., Pereira, D. S. P., Ramos, C. E. C. O., Cerqueira, R. B., Navarro, R. D. and Silva, R. F., 2017. Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquac Int. 25, 2035-2045. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0173-7>.

Paixão, P. E. G., Couto, M. V. S., Sousa, N. C., Abe, H. A., Reis, R. G. A., Dias, J. A. R., Meneses, J. O., Cunha, F. S., Santos, T. B. R., Silva, I. C. A., Medeiros, E. S. M., Fujimoto, R. Y., 2020. Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. Aquaculture. 526, 735395. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735395>.

Park, Y., Lee, S., Hong, J., Kim, D., Moniruzzaman, M., Bai, S. C., 2017. Use of probiotics to enhance growth, stimulate immunity and confer disease resistance to *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Res. 48, 2672-2682. <https://doi.org/10.1111/are.13099>.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes.

Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S.H., Soltani, M., Hoseinifar, S.H., Harikrishnan, R., Song, S.K., 2020. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* 29, 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>.

Santos, D. K. M., Kojima, J. T., Santana, T. M., Castro, D. P., Serra, P. T., Dantas, N. S. M., Fonseca, F. A. L., Mariúba, L. A. M., Gonçalves, L. U., 2021. Farming tambaqui (*Colossoma macropomum*) in static clear water versus a biofloc system with or without *Bacillus subtilis* supplementation. *Aquacult Int* 29, 207-218. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00618-w>.

Tachibana, L., Telli, G. S., Dias, D. C., Gonçalves, G. S., Ishikawa, C. M., Cavalcante, R. B., Natori, M. M., Hamed, S. B., Ranzani-Paiva, M. J. T., 2020. Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. *Aquacult Rep.* 16, 100277. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100277>.

Tan, H. Y., Chen, S. W., Hu, A. Y., 2019. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 92, 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.027>.

Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Byconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 38, 209-215.

Tuan, T. N., Duc, P. M., Hatai, K., 2013. Overview of the use of probiotics in aquaculture. *Int. J. Fish. Aquac.* 3, 89-97.

Valiollahi, J., Pourabasali, M., Janalizadeh, E., Bucio, A., 2018. Use of *Lactobacillus* for Improved Growth and Enhanced Biochemical, Hematological, and Digestive Enzyme Activity in Common Carp at Mazandaran, Iran. *N. Am. J. Aquac.* 80, 206-215. <https://doi.org/10.1002/naaq.10027>

Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* 51, 32-49.

Xia, Y., Yu, E., Lu, M., Xie, J., 2020. Effects of probiotic supplementation on gut microbiota as well as metabolite profiles within Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture.* 527, 735428. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735428>.

Yi, Y., Zhang, Z., Zhao, F., Liu, H., Yu, L., Zha, J., Wang, G., 2018. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and

immune enhancement effects on *Carassius auratus*. Fish Shellfish Immunol. 78, 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.055>.

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 Immunol. 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>.

Zorriezhahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Lazado, C.C., 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. Vet. Q. 36(4):228-241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>.

CAPÍTULO 3 – A seleção *in vitro* de bactérias ácido lácticas garante sua eficácia *in vivo* para o tambaqui?¹

Resumo

Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar duas cepas de bactérias ácido lácticas autóctones previamente isoladas, *Lactococcus lactis* e *Pediococcus pentosaceus* em duas concentrações 10^7 e 10^9 UFC g⁻¹ na saúde e desempenho do tambaqui *Colossoma macropomum*.

Métodos e Resultados

Um total de 560 tambaquis com peso médio de $59,25 \pm 8,36$ g, foram alimentados com *L. lactis* e *P. pentosaceus* nas concentrações 10^7 e 10^9 UFC g⁻¹ de ração e uma dieta controle (sem adição bacteriana). Nos dias 0, 15, 30 e 58 foram analisados os parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos, desempenho produtivo e na última coleta foi realizada a histoquímica intestinal, o desafio contra *Aeromonas hydrophila* e análise da composição microbiana intestinal. A cepa de *L. lactis* aumentou a quantidade de células caliciformes e a intensidade de secreção na região final do intestino dos peixes e as duas cepas apresentaram modulação da microbiota intestinal para esta espécie de peixe.

Conclusões

L. lactis e *P. pentosaceus* foram capazes de modular a microbiota do tambaqui, mas esta modulação não incrementou a saúde dos peixes.

Significado e impacto do estudo

O estudo mostrou que as cepas estudadas possuem potencial probiótico, porém para tambaquis, estudos adicionais devem ser realizados para melhorar a compreensão do tempo necessário para modulação do sistema imune destes animais.

Palavras-chave: aquicultura, *Colossoma macropomum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, probiótico

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico nas normas da revista Journal of Applied Microbiology.

Does the *in vitro* selection of lactic acid bacteria guarantee its *in vivo* efficacy for tambaqui?

Abstract

Aims

The aim of this study was to evaluate two previously isolated autochthonous lactic acid bacteria strains, *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus* at two concentrations 10^7 and 10^9 CFU g⁻¹ on the health and performance of the tambaqui *Colossoma macropomum*.

Methods and Results

A total of 560 tambaquis with an average weight of 59.25 ± 8.36 g, were fed with *L. lactis* and *P. pentosaceus* at concentrations of 10^7 and 10^9 CFU g⁻¹ of feed and a control diet (without bacterial addition). On days 0, 15, 30 and 58, the hematological, biochemical, immunological and productive performance parameters were analyzed. In the last collection, the intestinal histochemistry, the challenge against *Aeromonas hydrophila* and the analysis of the intestinal microbial composition were performed. The *L. lactis* strain increased the amount of goblet cells and the intensity of secretion in the final region of the fish intestine and both strains showed modulation of the intestinal microbiota for this fish species.

Conclusions

L. lactis and *P. pentosaceus* were able to modulate tambaqui microbiota, but this modulation did not improve fish health.

Significance and Impact of the Study

The study showed that the strains studied have probiotic potential, but for tambaquis, additional studies should be carried out to improve the understanding of the time needed to modulate the immune system of these animals

Keywords: aquaculture, *Colossoma macropomum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, probiotic

1 Introdução

Tambaqui *Colossoma macropomum* é uma espécie nativa da América do Sul, encontrado nas bacias do rio Amazonas e Orinoco, possui ampla criação em países da América do Sul e Central, além de países Asiáticos como China, Indonésia, Malásia, Mianmar e Vietnã (Woynárovich e Van Anrooy, 2019). Sua alta taxa de produção está diretamente relacionada a intensificação dos sistemas de criação, porém os peixes nesses sistemas são expostos a estresse agudo ou crônico como consequência do manejo, má qualidade da água e elevada densidade de estocagem (Dias et al., 2018). Todos o estresse sofrido aumenta a probabilidade de doenças causadas por diferentes patógenos, como parasitos e bactérias que reduzem a taxa de produção, a qualidade do pescado e prejudica a economia do país (Banerjee e Ray, 2017, Valladão et al., 2018).

Dentre os principais patógenos destaca-se a *Aeromonas hydrophila*, a qual está relacionada a surtos persistentes de septicemia na aquicultura continental (Rasmussen-Ivey et al., 2016). No tambaqui, esta espécie pode causar lesões como hemorragia, úlceras, letargia, natação irregular, melanose, corrosão de nadadeiras e anorexia (Gallani et al., 2020). Como forma de tratamento e até mesmo prevenção, os antimicrobianos são amplamente utilizados na aquicultura (Liu et al., 2017), o que pode levar ao surgimento de patógenos resistentes, resíduos no pescado e alteração da microbiota ambiental (Chen et al., 2019).

A busca por alternativas naturais, ecológicas e sustentáveis levam ao uso dos probióticos, que são definidos como "Microrganismos vivos que quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios a saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002). Seus efeitos benéficos estão relacionados a produção de compostos inibitórios, competição por sítios de adesão, competição por nutrientes, contribuição enzimática para digestão, aumento das respostas imunológicas e melhora na qualidade da água (Verschuere et al., 2000).

Entre as principais bactérias utilizadas como probióticos na aquicultura estão os *Bacillus* e as bactérias ácido lácticas (BAL) (Ringø et al., 2020). Esta última desperta grande interesse pelo seu importante papel na biopreservação e fermentação de alimentos (Alonso et al., 2019), por incrementar o desempenho produtivo modular a microbiota intestinal, o sistema imunológico e aumentar a resistência as doenças

(Ringø et al., 2020). Para o tambaqui, até o momento apenas cepas de *Bacillus* foram utilizadas como probiótico (Santos et al., 2021; Paixão et al., 2017; Azevedo et al., 2016; Ferreira et al., 2014) alóctones e (Dias et al., 2018) autóctone. Kotzent et al. (2021) isolaram quatro cepas autóctones de BAL de tambaqui saudáveis, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae*, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus hominis*, todas apresentaram capacidade de inibir bactérias patogênicas e baixa resistência aos principais antimicrobianos comerciais, além de outras características que as tornam favoráveis para serem testadas *in vivo*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar duas cepas de bactérias ácido lácticas autóctones do tambaqui, *Lactococcus lactis* e *Pediococcus pentosaceus* em duas concentrações 10^7 e 10^9 UFC g⁻¹ adicionadas a ração e fornecidas por 58 dias ao tambaqui e o efeito delas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos, desempenho produtivo, histoquímica intestinal, desafio contra *Aeromonas hydrophila* e composição microbiana intestinal.

2 Materiais e Métodos

Todos os procedimentos adotados no estudo estão de acordo com as normas dos princípios éticos em pesquisa animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, os quais foram aprovados sob o protocolo nº 005339/18.

2.1 Bactérias

As cepas bacterianas com potencial probiótico utilizadas neste estudo foram previamente selecionadas de juvenis de tambaqui saudáveis através de testes *in vitro* (Kotzent et al., 2021) e estão depositadas no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA-CAUNESP) sob o número de acesso gerado pelo GenBank KY305683 (*Pediococcus pentosaceus*), KY305684 (*Lactococcus lactis*). A cepa patogênica MT409620 (*Aeromonas hydrophila*) foi isolada de um surto infeccioso em tambaquis e teve sua patogenicidade comprovada por Gallani et al. (2020).

2.2 Preparo da dieta

Inicialmente, as cepas com potencial probiótico *L. lactis* e *P. pentosaceus* previamente identificadas através de sequenciamento do gene 16S rRNA, foram repicadas em placas de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Neogen, EUA) e submetidas a crescimento em estufa bacteriológica por 48 h a 35°C. Após o crescimento e confirmação da pureza das colônias através da observação de sua morfologia e coloração de Gram, foram preparados caldo MRS, em que as cepas de *L. lactis* cresceram durante 24 h e as de *P. pentosaceus* durante 48 h, ambas a 35°C. Após a confirmação do crescimento, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 3000xg a 4°C durante 10 min. O “pellet” resultante desta centrifugação foi ressuspensionado em solução salina tamponada de fosfato esterilizado (PBS), e lavado mais duas vezes. Após a lavagem, a cepa foi ressuspensionada em PBS e sua concentração determinada através de leituras em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Unico 2100, Japão) para as concentrações de 10^8 UFC mL⁻¹, previamente padronizadas através de leituras e plaqueamentos e para as concentrações de 10^{10} UFC mL⁻¹, as cepas foram anteriormente testadas para saber a quantidade de meio que deveriam ser crescidas para garantir essa concentração pois o espectrofotômetro não foi capaz de ler esta concentração. Após os ajustes, os preparos bacterianos foram diluídos seriadamente e as concentrações 10^{-3} a 10^{-7} foram plaqueadas em ágar MRS para contagem das UFCs viáveis.

Cada ração experimental recebeu 100 mL de PBS contendo as concentrações bacterianas pré-determinadas para cada quilograma de ração, cujo caldo contendo as bactérias foi misturado a ração manualmente durante cinco minutos para garantir uma mistura homogênea. A ração controle recebeu a mesma quantidade de PBS estéril. As rações foram secas em sala climatizada a 16°C durante 24 h e após este período armazenada em sala climatizada durante sete dias. O cultivo das cepas probióticas e o preparo da ração foram realizados semanalmente para garantir a manutenção das concentrações (10^7 e 10^9 UFC g⁻¹). A dieta base para todo o período experimental foi uma ração comercial (450 g Kg⁻¹ de proteína bruta, 120 g Kg⁻¹ de extrato etéreo, 45 g Kg⁻¹ de fibra bruta, 140 g Kg⁻¹ de matéria mineral, 15 g Kg⁻¹ de cálcio (mínimo), 25 g Kg⁻¹ de cálcio (máximo), 10 g Kg⁻¹ de fósforo, 100 g Kg⁻¹ de umidade, 0,6 g Kg⁻¹ de vitamina C) específica para peixes onívoros (Nutipiscis - Presence).

A viabilidade das cepas probióticas nas dietas foi avaliada através de diluições seriadas de amostras de ração em PBS estéril e plaqueadas em ágar MRS para contagem das UFC g⁻¹ e as colônias identificadas através de sua morfologia. A ração controle também foi plaqueada para garantir que não havia cepas probióticas em sua composição. Este processo, assim como o preparo das dietas experimentais foi repetido semanalmente para garantir a manutenção da concentração. As concentrações das cepas probióticas (UFC g⁻¹) foi, $5,73 \pm 3,60 \times 10^7$ (*L. lactis* 10⁷), $3,00 \pm 3,22 \times 10^9$ (*L. lactis* 10⁹), $5,31 \pm 2,80 \times 10^7$ (*P. pentosaceus* 10⁷) e $3,73 \pm 2,35 \times 10^9$ (*P. pentosaceus* 10⁹).

2.3 Condição experimental

Um total de 560 juvenis de tambaqui com peso médio de $59,25 \pm 8,36$ g, comprimento total de $16,07 \pm 0,80$ cm e comprimento padrão de $12,61 \pm 0,65$ cm, foram distribuídos aleatoriamente em 20 caixas experimentais com capacidade para 310 litros, divididos em cinco tratamentos (*L. lactis* 10⁷, *L. lactis* 10⁹, *P. pentosaceus* 10⁷, *P. pentosaceus* 10⁹ e controle), com quatro repetições cada, na densidade de 28 peixes por caixa, com aeração e renovação constante de água.

Durante o período experimental, as variáveis limnológicas (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade) foram monitoradas utilizando sonda multiparâmetros Water Quality Meter (AK88) (Tabela 1). Os animais foram alimentados três vezes ao dia (08h00; 12h45; 17h30) até a saciedade aparente, durante os 58 dias de experimento.

Tabela 1. Variáveis limnológicas nos grupos controle e suplementados com bactérias probióticas.

Tratamento	pH	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	Condutividade (µS cm ⁻¹)
Controle	$7,72 \pm 0,13$	$30,27 \pm 0,99$	$4,90 \pm 0,41$	$166,27 \pm 1,12$
<i>L. lactis</i> 10 ⁷	$7,74 \pm 0,16$	$30,30 \pm 0,94$	$5,05 \pm 1,27$	$165,90 \pm 0,89$
<i>L. lactis</i> 10 ⁹	$7,77 \pm 0,12$	$30,15 \pm 1,00$	$4,71 \pm 0,92$	$166,16 \pm 1,23$
<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	$7,74 \pm 0,12$	$30,33 \pm 0,97$	$4,04 \pm 1,39$	$165,98 \pm 0,91$
<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹	$7,76 \pm 0,15$	$30,27 \pm 0,94$	$4,58 \pm 0,97$	$165,88 \pm 0,78$

2.4 Parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos

Foram amostrados 60 peixes por coleta, sendo 12 peixes por tratamento, nos dias 0, 15, 30 e 58 após alimentação com as rações contendo as cepas potencialmente probióticas.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos, os peixes foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L^{-1}) e o sangue colhido por punção do vaso caudal. O sangue total foi aliquoteado em tubos tipo eppendorf contendo $20 \text{ }\mu\text{L}$ de heparina na concentração 100 UI mL^{-1} para determinação do hemograma completo e, em tubos sem heparina, para obtenção do soro. Ainda, uma gota foi destinada à confecção de esfregaço sanguíneo.

No sangue total foi determinado o hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), concentração de hemoglobina (Collier, 1944) e contagem total de eritrócitos (RBC) (Ranzani-Paiva et al. 2013). Os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizados de acordo com Wintrobe (1934). A contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2006) e observadas em microscópio óptico comum.

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada seguindo metodologia descrita por Biller-Takahashi (2013), em que em eppendorfs contendo $50 \text{ }\mu\text{L}$ de nitroazul de tetrazolium (NBT) foi adicionado $50 \text{ }\mu\text{L}$ de sangue. As amostras foram incubadas por 30 min no escuro em temperatura ambiente e $50 \text{ }\mu\text{L}$ desta solução foi adicionada à 1 mL de N,N-dimetilformamida agitada e centrifugada, a leitura realizada em espectrofotômetro (540 nm absorbância).

O restante do sangue total foi centrifugado ($1500\times g$ a 4°C durante 10 min) para separação do soro, o qual foi estocado a -80°C para posterior análise da concentração de proteína total, albumina, aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT). Todas as análises seguiram a recomendação do fabricante (Kit Labtest). Também foram realizadas análise da atividade sérica da lisozima e atividade do sistema complemento (AHC50).

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Zanuzzo et al. (2017).

A atividade do sistema complemento (via alternativa) foi estimada de acordo com a metodologia descrita por Zanuzzo et al. (2015). Para tanto, 90 µl de cada amostra de soro mais 10 µl de tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ (ácido trietanolamina etilenoglicol tetracético, 8 mM, 2 mM de Mg²⁺ e 0,1% de gelatina) foram adicionados à 200 µl de solução contendo eritrócitos de coelho (2 x 10⁸ células por mL). A atividade foi transformada pela seguinte fórmula: ACH50 = 1 / *leitura da amostra* de acordo com Zanuzzo et al. (2017).

2.5 Índice hepatossomático

Os mesmos 60 animais coletados no dia 58 para avaliação dos parâmetros hematológicos, imunológicos e bioquímicos, voltaram para o anestésico (solução alcoólica de benzocaína (100 mg L⁻¹), até a constatação da morte pela ausência de batimentos operculares. Os animais foram necropsiados e o fígado retirado para pesagem. O índice hepatossomático foi avaliado através da fórmula: IHS (%) = 100 (*peso do fígado / peso corporal final*).

2.6 Desempenho produtivo

Antes do início da alimentação com as dietas contendo os probióticos e nos dias 15, 30 e 58, os animais foram manejados para biometria e os seguintes parâmetros foram avaliados: ganho de peso- GP (g) = *peso corporal final* (g) - *peso corporal inicial* (g); ganho de peso diário- GPD = *ganho de peso* (g) / *nº de dias*; consumo médio diário- CMD (g) = [*consumo / nº de peixes / nº dias*]; consumo total por período- CTP; taxa de conversão alimentar- TCA (g/g) = *consumo de alimento* (g) / *ganho de peso*(g); taxa de crescimento específico- TCE (%) = 100 [(*ln peso corporal final* - *ln peso corporal inicial*) / *dias experimentais*].

2.7 Resistência à infecção por *Aeromonas hydrophila*

Após a biometria no dia 58, todos os peixes de todos os tratamentos foram avaliados quanto à sua resistência à bactéria *A. hydrophila*. A cepa foi cultivada em TSA (ágar triptona soja, Neogen, EUA) durante 24 h a 28°C. Após o crescimento em placa, a cepa foi transferida para TSB (caldo triptona soja, Neogen, EUA) e incubada durante 24 h a 28°C. O crescimento foi confirmado através da turvação do caldo e a

cultura bacteriana foi centrifugada a 3000xg a 4°C durante 10 min. O “pellet” resultante desta centrifugação foi ressuspensionado em PBS e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes para completa retirada do meio de cultura. Após a lavagem, a cepa foi ressuspensionada em PBS e sua concentração determinada por densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀). A dose foi estabelecida após realização da DL₅₀ (foram testadas diferentes doses até estabelecer a dose que atingisse a mortalidade de 50% dos animais). Para a DL₅₀, os peixes foram divididos em caixas d’água na densidade de 10 peixes/caixa) e a dose letal determinada foi 0,423 OD₆₀₀ equivalente a $1,16 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Os animais foram inoculados intraperitonealmente (14 peixes por caixa) na quantidade de 0,1 ml de inóculo ($1,16 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) para cada 10 g de peixe e os sinais clínicos, o comportamento e a mortalidade diária foram monitorados durante 16 dias.

2.8 Histoquímica intestinal

No dia 58, após a colheita sanguínea, os três animais de cada caixa (12 por tratamento), foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L⁻¹) e os intestinos excisados por corte longitudinal de modo a manter as vilosidades expostas e fixados individualmente em formol tamponado 10% durante 24 h e desidratadas em série ascendente de álcool diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina, para obtenção de cortes histológicos semisseriados. As amostras foram divididas em três regiões (anterior, médio e posterior) e cortadas (5 µm de espessura) para obtenção das lâminas e coradas com hematoxilina eosina (H&E) para análise estrutural das amostras e com ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de secreção de mucosubstâncias neutras pelas células caliciformes. Também foi realizada a reação de PAS + AB pH 2,5 (Azul de Alcian) para a detecção de muco substâncias conjugadas (neutras + ácidas) pelas células caliciformes. A seguir, foram realizadas as reações de AB pH 2,5 e AB pH 0,5 para a detecção de secreção de mucosubstâncias ácidas carboxiladas e sulfatadas (Behmer et al., 1976).

2.9 Análise da composição microbiana intestinal

No dia 58, foram coletados 15 peixes (que não passaram por colheita sanguínea), compondo três peixes por tratamento. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em solução alcoólica de benzocaína (100 mg L⁻¹), lavados e limpos com álcool 70%, levados para fluxo laminar, onde foram necropsiados de forma asséptica e os intestinos foram excisados, abertos e lavados com solução PBS estéril, para retirada do material fecal e microrganismos não fixadores e mantidos em tubos tipo eppendorf estéreis em freezer -80°C até sua utilização.

Para coleta da microbiota intestinal, os intestinos foram raspados com alça bacteriológica estéril e seu conteúdo depositado em tubos contendo solução NeoSample-Z (Neoprospecta). As análises das amostras foram realizadas através da metodologia DMD, utilizando o sequenciamento de DNA em larga escala por NGS (Next Generation Sequencing). Para esta identificação foram utilizadas regiões universais do DNA de bactérias que codificam partes do RNA ribossomal (16S rRNA), utilizando cobertura média de 50 mil reads, paired-end.

2.10 Forma de análise dos resultados

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaStat (versão 3.5). Os dados foram analisados através de two-way ANOVA, sendo consideradas diferenças significativas quando verificadas probabilidades inferiores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 Resultados

3.1 Análises hematológicas

A adição das duas cepas probióticas à ração nas concentrações 10⁷ e 10⁹ UFC g⁻¹ não afetou os parâmetros hematológicos do tambaqui ($p > 0,05$) (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após 0, 15, 30 e 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10^7 UFC g^{-1} , *Lactococcus lactis* 10^9 UFC g^{-1} , *Pediococcus pentosaceus* 10^7 UFC g^{-1} e *Pediococcus pentosaceus* 10^9 UFC g^{-1} .

Parâmetros hematológicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Hematócrito (%)	24,80 ± 10,33	25,00 ± 2,21	22,91 ± 2,67	25,09 ± 8,15	22,81 ± 7,25
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	6,39 ± 0,53	6,31 ± 0,50	6,45 ± 0,63	6,44 ± 0,50	6,33 ± 0,56
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,72 ± 0,27	1,68 ± 0,17	1,83 ± 0,30	1,78 ± 0,15	1,73 ± 0,16
VCM (fL)	145,68 ± 60,57	148,96 ± 11,70	126,14 ± 13,10	140,40 ± 47,56	131,83 ± 39,81
HCM (pg)	37,55 ± 4,45	37,60 ± 2,67	35,61 ± 3,83	36,35 ± 3,45	36,65 ± 1,59
CHCM (%)	25,82 ± 10,41	25,29 ± 1,28	28,34 ± 2,86	26,08 ± 8,06	27,97 ± 8,34
Parâmetros hematológicos	15 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Hematócrito (%)	27,66 ± 1,92	27,75 ± 2,52	27,25 ± 2,37	27,16 ± 2,36	26,50 ± 2,54
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,45 ± 0,38	7,26 ± 0,44	7,16 ± 0,37	6,96 ± 0,32	7,12 ± 0,41
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,93 ± 0,13	1,92 ± 0,14	1,91 ± 0,19	1,96 ± 0,25	1,84 ± 0,12
VCM (fL)	143,18 ± 12,41	145,30 ± 17,65	143,83 ± 17,68	140,29 ± 20,79	143,89 ± 15,17
HCM (pg)	38,53 ± 2,39	37,90 ± 2,13	37,82 ± 3,72	35,95 ± 4,71	38,68 ± 2,15
CHCM (%)	27,03 ± 2,19	26,38 ± 2,92	26,47 ± 2,70	25,81 ± 2,55	27,16 ± 3,40
Parâmetros hematológicos	30 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Hematócrito (%)	29,66 ± 2,05	30,08 ± 2,10	30,50 ± 1,67	29,91 ± 2,15	28,75 ± 2,17
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,79 ± 0,82	7,95 ± 0,55	8,06 ± 0,74	8,22 ± 0,47	7,63 ± 0,43
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,91 ± 0,07	1,94 ± 0,15	1,94 ± 0,19	1,91 ± 0,11	1,86 ± 0,13
VCM (fL)	154,98 ± 8,11	154,87 ± 11,86	157,62 ± 13,10	156,43 ± 10,48	154,54 ± 12,49
HCM (pg)	40,82 ± 4,85	40,94 ± 3,20	41,63 ± 4,31	43,08 ± 3,53	41,03 ± 2,17
CHCM (%)	26,37 ± 3,16	26,52 ± 2,38	26,41 ± 1,71	27,61 ± 2,51	26,63 ± 1,45
Parâmetros hematológicos	58 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Hematócrito (%)	28,54 ± 8,53	28,50 ± 2,90	25,75 ± 1,95	26,90 ± 8,57	27,16 ± 2,75
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,73 ± 2,30	7,98 ± 0,74	7,44 ± 0,50	7,77 ± 2,28	7,75 ± 0,56
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)	1,79 ± 0,54	1,76 ± 0,16	1,62 ± 0,11	1,73 ± 0,52	1,72 ± 0,19
VCM (fL)	160,04 ± 48,12	162,15 ± 12,98	159,38 ± 14,71	155,06 ± 48,25	158,02 ± 12,15
HCM (pg)	43,33 ± 12,99	45,50 ± 3,61	46,05 ± 3,96	45,01 ± 13,41	45,18 ± 3,05
CHCM (%)	27,17 ± 8,14	28,17 ± 2,62	28,94 ± 1,46	29,60 ± 10,32	28,71 ± 2,53

Tabela 3. Contagem total e diferencial dos leucócitos de *Colossoma macropomum* após 0, 15, 30 e 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10^7 UFC g^{-1} , *Lactococcus lactis* 10^9 UFC g^{-1} , *Pediococcus pentosaceus* 10^7 UFC g^{-1} e *Pediococcus pentosaceus* 10^9 UFC g^{-1} .

Parâmetros hematológicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Trombócitos ($\times 10^3$ mm ⁻³)	15,26 ± 8,80	19,11 ± 11,63	17,80 ± 12,14	8,99 ± 9,60	16,19 ± 10,06

Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	17,78 $\pm$ 13,64	20,01 $\pm$ 16,42	23,77 $\pm$ 19,82	14,98 $\pm$ 11,00	16,96 $\pm$ 12,14
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	14,28 $\pm$ 13,46	16,78 $\pm$ 15,41	18,93 $\pm$ 18,69	11,58 $\pm$ 10,46	13,84 $\pm$ 11,11
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	3,80 $\pm$ 2,37	3,74 $\pm$ 3,39	6,19 $\pm$ 9,11	2,82 $\pm$ 3,80	2,33 $\pm$ 2,23
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	29,58 $\pm$ 15,69	25,95 $\pm$ 13,44	36,94 $\pm$ 18,31	29,99 $\pm$ 12,54	26,59 $\pm$ 11,41
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	4,32 $\pm$ 7,19	12,37 $\pm$ 17,49	26,41 $\pm$ 35,83	1,49 $\pm$ 2,99	7,30 $\pm$ 13,58
Eosinófilos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	9,27 $\pm$ 10,25	10,90 $\pm$ 11,67	16,47 $\pm$ 16,69	7,64 $\pm$ 6,53	10,83 $\pm$ 8,72
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	2,62 $\pm$ 2,81	2,18 $\pm$ 3,01	9,19 $\pm$ 10,63	2,25 $\pm$ 2,76	4,56 $\pm$ 6,38
15 dias					
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	25,07 $\pm$ 13,50	27,49 $\pm$ 12,72	25,28 $\pm$ 10,25	28,66 $\pm$ 12,37	28,14 $\pm$ 12,54
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	19,23 $\pm$ 5,95	17,79 $\pm$ 6,26	20,54 $\pm$ 7,59	20,21 $\pm$ 6,44	19,24 $\pm$ 10,00
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	16,61 $\pm$ 6,77	14,59 $\pm$ 5,68	17,85 $\pm$ 7,78	17,73 $\pm$ 6,18	16,78 $\pm$ 9,33
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	5,24 $\pm$ 3,36	4,99 $\pm$ 3,35	6,86 $\pm$ 3,68	7,58 $\pm$ 3,61	8,64 $\pm$ 5,01
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	17,28 $\pm$ 18,88	23,21 $\pm$ 13,78	16,86 $\pm$ 16,13	14,02 $\pm$ 11,19	11,13 $\pm$ 9,32
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	15,99 $\pm$ 12,27	14,03 $\pm$ 11,31	12,66 $\pm$ 14,47	13,03 $\pm$ 13,67	17,77 $\pm$ 23,82
Eosinófilos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	12,48 $\pm$ 16,53	20,91 $\pm$ 20,82	9,89 $\pm$ 16,61	16,32 $\pm$ 14,20	20,49 $\pm$ 30,42
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	8,38 $\pm$ 6,25	2,75 $\pm$ 5,38	9,48 $\pm$ 10,83	3,44 $\pm$ 5,42	9,51 $\pm$ 14,66
30 dias					
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	33,15 $\pm$ 13,67	31,17 $\pm$ 17,01	29,94 $\pm$ 18,05	34,62 $\pm$ 13,75	31,21 $\pm$ 16,38
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	24,30 $\pm$ 12,97	16,47 $\pm$ 6,98	18,88 $\pm$ 7,73	23,86 $\pm$ 10,19	19,91 $\pm$ 7,38
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	21,94 $\pm$ 12,27	14,68 $\pm$ 6,34	16,36 $\pm$ 7,57	21,54 $\pm$ 9,43	17,83 $\pm$ 6,91
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	9,83 $\pm$ 4,36	7,65 $\pm$ 4,14	8,39 $\pm$ 3,96	9,22 $\pm$ 4,49	7,84 $\pm$ 4,18
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	8,45 $\pm$ 5,60	7,34 $\pm$ 4,24	14,66 $\pm$ 13,92	9,82 $\pm$ 8,68	10,11 $\pm$ 5,94
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	11,85 $\pm$ 17,55	8,18 $\pm$ 12,74	8,33 $\pm$ 12,89	9,51 $\pm$ 14,25	12,96 $\pm$ 27,79
Eosinófilos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	28,73 $\pm$ 31,92	13,51 $\pm$ 20,35	7,71 $\pm$ 10,20	17,22 $\pm$ 14,05	12,65 $\pm$ 12,14
Basófilos (mm^{-3})	0	0	0	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	12,34 $\pm$ 23,51	6,97 $\pm$ 11,85	4,83 $\pm$ 6,87	14,54 $\pm$ 19,86	2,90 $\pm$ 5,50
58 dias					
Trombócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	35,85 $\pm$ 12,22	18,97 $\pm$ 14,26	23,03 $\pm$ 6,70	24,78 $\pm$ 16,89	27,56 $\pm$ 5,06
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	25,35 $\pm$ 14,16	17,69 $\pm$ 7,22	21,50 $\pm$ 13,62	14,33 $\pm$ 5,64	22,02 $\pm$ 10,54
Linfócitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	23,08 $\pm$ 13,16	14,81 $\pm$ 5,62	19,30 $\pm$ 13,55	12,22 $\pm$ 4,90	18,81 $\pm$ 10,88
Monócitos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	8,67 $\pm$ 9,65	7,54 $\pm$ 5,23	7,94 $\pm$ 4,91	7,59 $\pm$ 4,33	9,48 $\pm$ 2,15
Neutrófilos ($\times 10^2 \text{ mm}^{-3}$)	9,40 $\pm$ 3,95	18,62 $\pm$ 18,59	10,98 $\pm$ 8,54	11,74 $\pm$ 6,39	18,36 $\pm$ 10,48
CGE ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	16,10 $\pm$ 17,33	12,16 $\pm$ 12,48	9,31 $\pm$ 11,51	5,69 $\pm$ 7,40	8,83 $\pm$ 14,40
Eosinófilos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	21,03 $\pm$ 46,23	3,92 $\pm$ 6,35	16,66 $\pm$ 17,28	8,17 $\pm$ 8,77	29,07 $\pm$ 38,32
Basófilos (mm^{-3})	10,21 $\pm$ 27,02	0	7,33 $\pm$ 20,73	0	0
Leu. imaturos ($\times 10^1 \text{ mm}^{-3}$)	8,59 $\pm$ 10,04	9,69 $\pm$ 9,79	3,54 $\pm$ 5,51	3,69 $\pm$ 5,60	4,47 $\pm$ 9,41

3.2 Análises bioquímicas

A proteína total, albumina, globulina, albumina:globulina, ALT e AST não foram alteradas após alimentação por 58 dias com as dietas contendo as bactérias probióticas ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de *Colossoma macropomum* após 0, 15, 30 e 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10⁷ UFC g⁻¹, *Lactococcus lactis* 10⁹ UFC g⁻¹, *Pediococcus pentosaceus* 10⁷ UFC g⁻¹ e *Pediococcus pentosaceus* 10⁹ UFC g⁻¹.

Parâmetros bioquímicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10 ⁷	<i>L. lactis</i> 10 ⁹	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹
Proteína (g dL ⁻¹)	3,07 ± 0,32	2,89 ± 0,28	3,12 ± 0,28	3,07 ± 0,32	2,87 ± 0,35
Albumina (g dL ⁻¹)	0,60 ± 0,04	0,58 ± 0,06	0,62 ± 0,06	0,63 ± 0,08	0,63 ± 0,10
Globulina (g dL ⁻¹)	2,47 ± 0,30	2,31 ± 0,31	2,51 ± 0,27	2,44 ± 0,32	2,25 ± 0,36
A:G (g dL ⁻¹)	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,07
ALT (U L ⁻¹)	8,68 ± 4,73	9,57 ± 4,36	12,04 ± 5,59	12,05 ± 3,38	10,83 ± 4,01
AST (U L ⁻¹)	59,33 ± 10,38	59,07 ± 6,54	60,30 ± 13,93	61,68 ± 11,61	58,92 ± 13,31
15 dias					
Proteína (g dL ⁻¹)	3,90 ± 0,28	3,73 ± 0,29	3,76 ± 1,72	3,64 ± 0,30	3,71 ± 0,33
Albumina (g dL ⁻¹)	0,78 ± 0,06	0,75 ± 0,23	0,75 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,74 ± 0,07
Globulina (g dL ⁻¹)	3,13 ± 0,26	2,95 ± 0,88	3,00 ± 1,37	2,93 ± 0,33	2,97 ± 0,29
A:G (g dL ⁻¹)	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,08	0,25 ± 0,11	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,02
ALT (U L ⁻¹)	15,24 ± 4,74	14,55 ± 4,66	14,19 ± 3,49	13,29 ± 3,04	15,83 ± 4,81
AST (U L ⁻¹)	73,96 ± 16,51	74,57 ± 14,07	65,08 ± 12,61	67,52 ± 13,01	70,32 ± 16,03
30 dias					
Proteína (g dL ⁻¹)	4,02 ± 1,18	3,92 ± 1,58	4,00 ± 1,23	3,96 ± 0,29	4,04 ± 1,59
Albumina (g dL ⁻¹)	0,77 ± 0,30	0,76 ± 0,30	0,75 ± 0,23	0,74 ± 0,05	0,74 ± 0,29
Globulina (g dL ⁻¹)	3,23 ± 1,27	3,16 ± 1,29	3,25 ± 1,01	3,23 ± 0,29	3,31 ± 1,30
A:G (g dL ⁻¹)	0,24 ± 0,09	0,25 ± 0,10	0,24 ± 0,07	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,08
ALT (U L ⁻¹)	12,77 ± 3,39	13,65 ± 2,89	14,84 ± 4,35	14,52 ± 6,70	15,94 ± 3,86
AST (U L ⁻¹)	77,25 ± 25,39	66,88 ± 11,20	73,93 ± 22,11	70,07 ± 9,91	74,88 ± 12,31
58 dias					
Proteína (g dL ⁻¹)	3,21 ± 0,23	3,38 ± 0,38	3,32 ± 0,25	3,22 ± 0,22	3,28 ± 0,29
Albumina (g dL ⁻¹)	0,64 ± 0,04	0,65 ± 0,19	0,65 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,65 ± 0,03
Globulina (g dL ⁻¹)	2,57 ± 0,23	2,71 ± 0,86	2,67 ± 0,25	2,57 ± 0,22	2,64 ± 0,30
A:G (g dL ⁻¹)	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,08	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,03
ALT (U L ⁻¹)	14,04 ± 5,68	11,99 ± 4,05	15,30 ± 6,83	10,68 ± 2,85	12,22 ± 2,92
AST (U L ⁻¹)	77,21 ± 18,48	64,72 ± 10,98	77,08 ± 16,44	63,81 ± 11,45	66,82 ± 9,35

Albumina:Globulina (A:G)

3.3 Análises imunológicas

O complemento, a lisozima e a atividade respiratória dos leucócitos (burst oxidativo) não foram alterados após alimentação por 58 dias com as dietas contendo as bactérias probióticas ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros imunológicos de *Colossoma macropomum* após 0, 15, 30 e 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10⁷ UFC g⁻¹, *Lactococcus lactis* 10⁹ UFC g⁻¹, *Pediococcus pentosaceus* 10⁷ UFC g⁻¹ e *Pediococcus pentosaceus* 10⁹ UFC g⁻¹.

Parâmetros imunológicos	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10 ⁷	<i>L. lactis</i> 10 ⁹	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹
Complemento (min)	29,00 ± 18,15	23,60 ± 8,59	40,73 ± 36,46	29,02 ± 18,51	29,26 ± 19,73
Lisozima (x10 ² ng µL ⁻¹)	10,63 ± 8,27	12,72 ± 10,35	10,33 ± 2,47	11,40 ± 11,78	8,74 ± 2,49
Burst (OD)	0,387 ± 0,022	0,373 ± 0,028	0,383 ± 0,0434	0,377 ± 0,022	0,372 ± 0,019
	15 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10 ⁷	<i>L. lactis</i> 10 ⁹	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹
Complemento (min)	34,08 ± 20,70	36,83 ± 24,37	29,43 ± 16,70	38,77 ± 22,49	25,65 ± 7,53
Lisozima (x10 ² ng µL ⁻¹)	13,39 ± 7,74	12,28 ± 6,72	10,42 ± 5,60	13,43 ± 8,48	10,60 ± 4,00
Burst (OD)	0,454 ± 0,020	0,443 ± 0,030	0,451 ± 0,020	0,447 ± 0,017	0,451 ± 0,014
	30 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10 ⁷	<i>L. lactis</i> 10 ⁹	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹
Complemento (min)	22,10 ± 10,97	30,35 ± 33,05	19,20 ± 10,17	30,62 ± 17,60	21,25 ± 14,48
Lisozima (x10 ² ng µL ⁻¹)	7,40 ± 3,94	8,63 ± 4,69	7,69 ± 3,77	9,44 ± 2,73	10,91 ± 10,48
Burst (OD)	0,392 ± 0,012	0,395 ± 0,015	0,387 ± 0,017	0,390 ± 0,017	0,388 ± 0,013
	58 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10 ⁷	<i>L. lactis</i> 10 ⁹	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹
Complemento (min)	60,80 ± 56,34	69,69 ± 66,92	188,36 ± 448,32	44,52 ± 23,72	143,80 ± 217,68
Lisozima (x10 ² ng µL ⁻¹)	9,25 ± 2,96	10,67 ± 4,24	10,27 ± 4,54	9,95 ± 4,90	9,27 ± 4,87
Burst (OD)	0,384 ± 0,114	0,382 ± 0,019	0,389 ± 0,113	0,382 ± 0,111	0,372 ± 0,018

3.4 Índice hepatossomático

O índice hepatossomático não foi alterado após alimentação por 58 dias com as dietas contendo as bactérias probióticas ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Índice hepatossomático de *Colossoma macropomum* após 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10⁷ UFC g⁻¹, *Lactococcus lactis* 10⁹ UFC g⁻¹, *Pediococcus pentosaceus* 10⁷ UFC g⁻¹ e *Pediococcus pentosaceus* 10⁹ UFC g⁻¹.

Índice hepatossomático (%)	58 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10 ⁷	<i>L. lactis</i> 10 ⁹	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁷	<i>P. pentosaceus</i> 10 ⁹
	1,67 ± 0,25	1,79 ± 0,42	1,73 ± 0,26	1,53 ± 0,52	1,67 ± 0,32

3.5 Desempenho produtivo

A adição das bactérias potenciais probióticas à ração na concentração 10⁷ e 10⁹ UFC/g não afetou o desempenho produtivo do tambaqui ($p > 0,05$) (Tabela 7 e 8).

Tabela 7. Desempenho produtivo de *Colossoma macropomum* após 0, 15, 30 e 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10^7 UFC g^{-1} , *Lactococcus lactis* 10^9 UFC g^{-1} , *Pediococcus pentosaceus* 10^7 UFC g^{-1} e *Pediococcus pentosaceus* 10^9 UFC g^{-1} .

Desempenho produtivo	0 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Peso (g)	59,28 ± 1,96	59,09 ± 2,45	58,54 ± 2,20	59,69 ± 1,21	58,48 ± 2,66
CT (cm)	16,15 ± 0,42	16,12 ± 0,48	16,02 ± 0,25	16,31 ± 0,27	15,97 ± 0,50
CP (cm)	12,58 ± 0,22	12,74 ± 0,24	12,55 ± 0,14	12,74 ± 0,17	12,53 ± 0,21
Desempenho produtivo	15 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Peso (g)	75,06 ± 6,62	75,55 ± 5,62	75,28 ± 2,94	75,84 ± 2,24	73,03 ± 2,51
CT (cm)	17,28 ± 0,57	17,22 ± 0,45	17,24 ± 0,16	17,28 ± 0,08	17,09 ± 0,19
CP (cm)	13,65 ± 0,54	13,77 ± 0,41	13,68 ± 0,26	13,64 ± 0,18	13,47 ± 0,20
Desempenho produtivo	30 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Peso (g)	88,20 ± 10,42	87,60 ± 6,41	88,09 ± 4,11	87,86 ± 3,51	83,42 ± 2,88
CT (cm)	17,83 ± 0,86	17,78 ± 0,44	17,58 ± 0,23	17,77 ± 0,30	17,43 ± 0,26
CP (cm)	14,28 ± 0,77	14,23 ± 0,42	14,26 ± 0,33	14,18 ± 0,39	13,99 ± 0,12
Desempenho produtivo	58 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
Peso (g)	131,26 ± 21,49	130,35 ± 14,50	132,50 ± 14,47	122,45 ± 14,05	121,86 ± 3,65
CT (cm)	19,57 ± 0,94	19,53 ± 0,68	19,63 ± 0,67	19,05 ± 0,61	18,96 ± 0,19
CP (cm)	14,93 ± 0,86	14,94 ± 0,68	15,13 ± 0,68	14,77 ± 0,65	14,68 ± 0,31

Comprimento total (CT); Comprimento padrão (CP)

Tabela 8. Desempenho produtivo de *Colossoma macropomum* após 0, 15, 30 e 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10^7 UFC g^{-1} , *Lactococcus lactis* 10^9 UFC g^{-1} , *Pediococcus pentosaceus* 10^7 UFC g^{-1} e *Pediococcus pentosaceus* 10^9 UFC g^{-1} .

Desempenho produtivo	0-15 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
GP (g)	15,78 ± 4,78	16,45 ± 3,59	16,74 ± 1,07	16,15 ± 1,90	14,54 ± 2,78
GPD (g)	1,05 ± 0,31	1,09 ± 0,23	1,11 ± 0,07	1,07 ± 0,12	0,96 ± 0,18
CMD (g)	1,74 ± 0,31	1,74 ± 0,16	1,72 ± 0,01	1,73 ± 0,09	1,66 ± 0,14
CTP ($\times 10^1$ g)	65,58 ± 11,66	65,55 ± 6,24	64,63 ± 0,68	65,18 ± 3,57	62,60 ± 5,31
TCA ($g\ g^{-1}$)	1,71 ± 0,25	1,62 ± 0,19	1,54 ± 0,10	1,62 ± 0,13	1,76 ± 0,30
TCE (%)	1,55 ± 0,38	1,62 ± 0,26	1,67 ± 0,08	1,59 ± 0,17	1,48 ± 0,29
Desempenho produtivo	15-30 dias				
	Controle	<i>L. lactis</i> 10^7	<i>L. lactis</i> 10^9	<i>P. pentosaceus</i> 10^7	<i>P. pentosaceus</i> 10^9
GP (g)	13,14 ± 4,99	12,04 ± 1,82	12,81 ± 2,00	12,01 ± 2,63	10,38 ± 3,42
GPD (g)	0,87 ± 0,33	0,80 ± 0,12	0,85 ± 0,13	0,80 ± 0,17	0,69 ± 0,22
CMD (g)	1,45 ± 0,31	1,38 ± 0,08	1,39 ± 0,08	1,37 ± 0,10	1,41 ± 0,21
CTP ($\times 10^1$ g)	47,92 ± 10,43	45,69 ± 2,69	46,06 ± 2,64	45,32 ± 3,59	46,58 ± 7,24
TCA ($g\ g^{-1}$)	1,73 ± 0,31	1,75 ± 0,27	1,65 ± 0,16	1,74 ± 0,22	2,15 ± 0,59

TCE (%)	0,88 ± 0,14	0,98 ± 0,13	1,04 ± 0,14	0,97 ± 0,19	0,88 ± 0,28
30-58 dias					
GP (g)	43,05 ± 11,58	42,74 ± 9,93	44,33 ± 12,05	34,58 ± 10,88	38,44 ± 1,43
GPD (g)	1,53 ± 0,41	1,52 ± 0,35	1,58 ± 0,43	1,23 ± 0,38	1,37 ± 0,05
CMD (g)	2,40 ± 0,52	2,42 ± 0,31	2,48 ± 0,40	2,21 ± 0,37	2,28 ± 0,22
CTP (x10 ¹ g)	12,77 ± 2,78	12,90 ± 1,66	13,22 ± 2,17	11,75 ± 1,99	12,14 ± 1,18
TCA (g g ⁻¹)	1,58 ± 0,09	1,62 ± 0,21	1,61 ± 0,21	1,88 ± 0,39	1,66 ± 0,12
TCE (%)	1,40 ± 0,20	1,40 ± 0,24	1,44 ± 0,31	1,168 ± 0,30	1,35 ± 0,04

Ganho de peso (GP); Ganho de peso diário (GPD); Consumo médio diário (CMD); Consumo total por período (CTP); Taxa de conversão alimentar (TCA); Taxa de crescimento específico (TCE)

3.6 Resistência à infecção por *Aeromonas hydrophila*

A adição das cepas com potencial probiótico à ração na concentração 10⁷ e 10⁹ UFC g⁻¹ não afetou a sobrevivência dos tambaquis após desafio bacteriano ($p > 0,05$) (Figura 1).

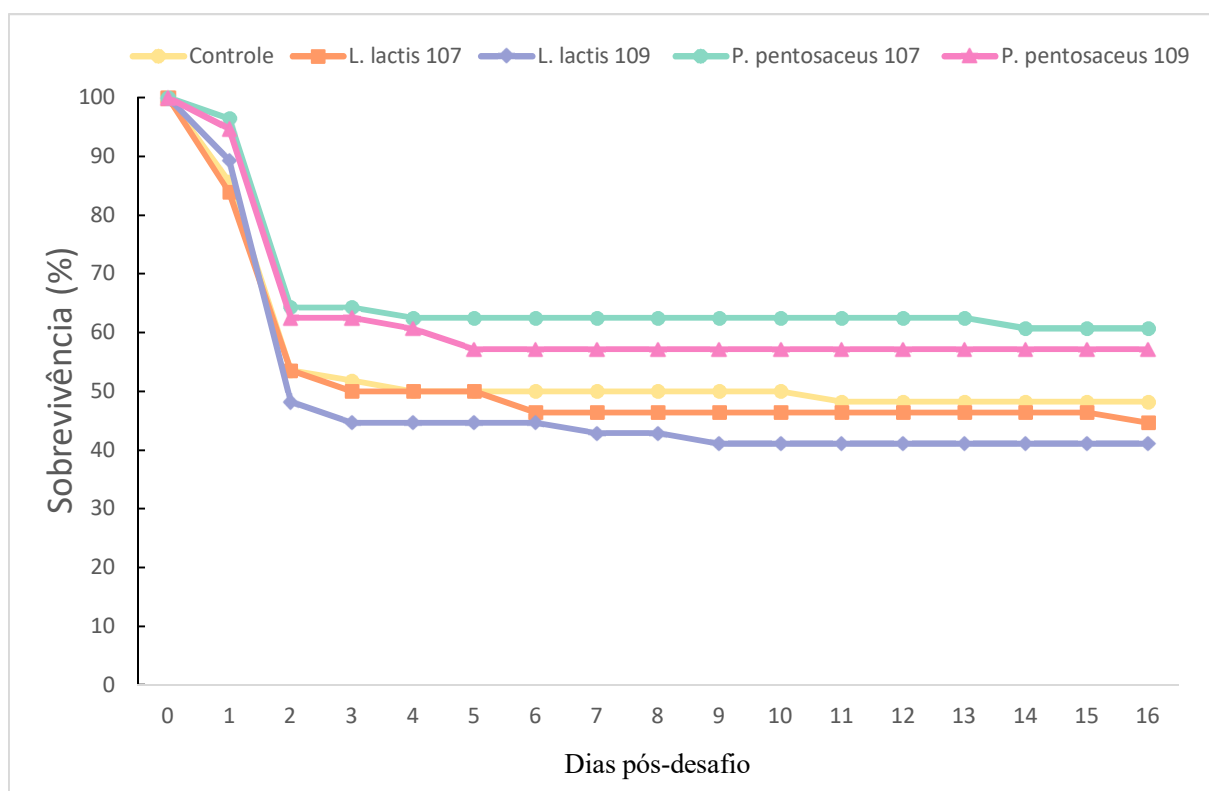


Figura 1. Sobrevivência de *Colossoma macropomum* desafiados contra *Aeromonas hydrophila*, após 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10⁷ UFC g⁻¹, *Lactococcus lactis* 10⁹ UFC g⁻¹, *Pediococcus pentosaceus* 10⁷ UFC g⁻¹ e *Pediococcus pentosaceus* 10⁹.

3.7 Histoquímica intestinal

A reação de H&E (Figura 2), demonstrou que o intestino anterior do grupo que não recebeu ração contendo bactérias probióticas (controle) estava organizado histologicamente por duas camadas musculares, sendo uma circular externa e uma longitudinal interna. Após a camada muscular, encontra-se a submucosa, formada por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos. Acima da submucosa, a formação mucosa formada por um epitélio prismático/colunar simples com a presença de células caliciformes. A área absortiva apresentava uma densa camada de muco, dando origem a borda em escova. O intestino médio deste mesmo grupo apresentou organização histológica similar ao anterior, porém com maior número de vilosidades intestinais. O intestino posterior apresentou organização similar aos anteriores, com maior espaçamento entre as vilosidades intestinais.

O intestino anterior, médio e posterior dos peixes alimentados com as dietas contendo *Lactococcus lactis* 10^7 , *Lactococcus lactis* 10^9 , *Pediococcus pentosaceus* 10^7 e *Pediococcus pentosaceus* 10^9 apresentaram organização histológica similar ao controle.

Na reação de PAS, as vilosidades intestinais do intestino anterior, médio e posterior do grupo controle, apresentaram entre as células do epitélio absortivo, células caliciformes secretoras de mucosubstâncias neutras que auxiliam na formação da borda em escova protetora da região absortiva dos enterócitos. Na região anterior e posterior a quantidade relativa de células caliciformes foi menor, quando comparada a região média, sendo assim, ocorreu maior secreção de mucosubstâncias neutras nestas regiões. A região de sustentação do tecido epitelial absortivo apresenta baixa intensidade à reação de PAS.

Nos grupos alimentados com as duas concentrações de *Lactococcus lactis* (10^7 e 10^9) ocorreram diminuição da intensidade de secreção de muco substâncias neutras pelas células caliciformes na região anterior do intestino e aumento da presença de células caliciformes e da intensidade de secreção na região posterior. Nos grupos alimentados com rações contendo *Pediococcus pentosaceus* (10^7 e 10^9) ocorreram diminuição das células caliciformes na região anterior e média, com diminuição da intensidade de secreção de mucosubstâncias neutras nestas regiões.

Na avaliação da reação PAS + AB pH 2,5, no grupo controle verificou-se que as células caliciformes das três regiões do intestino secretam mucosubstâncias neutras e ácidas (conjugadas), entretanto o padrão da borda em escova é mais neutro (reação do PAS isolado), com menor presença de mucosubstâncias conjugadas. Nos grupos alimentados com dieta suplementada com 10^7 e 10^9 de *Lactococcus lactis* ocorreram menor presença de células caliciformes secretoras de mucosubstâncias conjugadas em relação ao controle, porém o padrão destas na borda em escova foi similar. A diminuição de células caliciformes secretoras de mucosubstâncias conjugadas também ocorreram nos grupos alimentados com ração suplementada com 10^7 e 10^9 de *Pediococcus pentosaceus*.

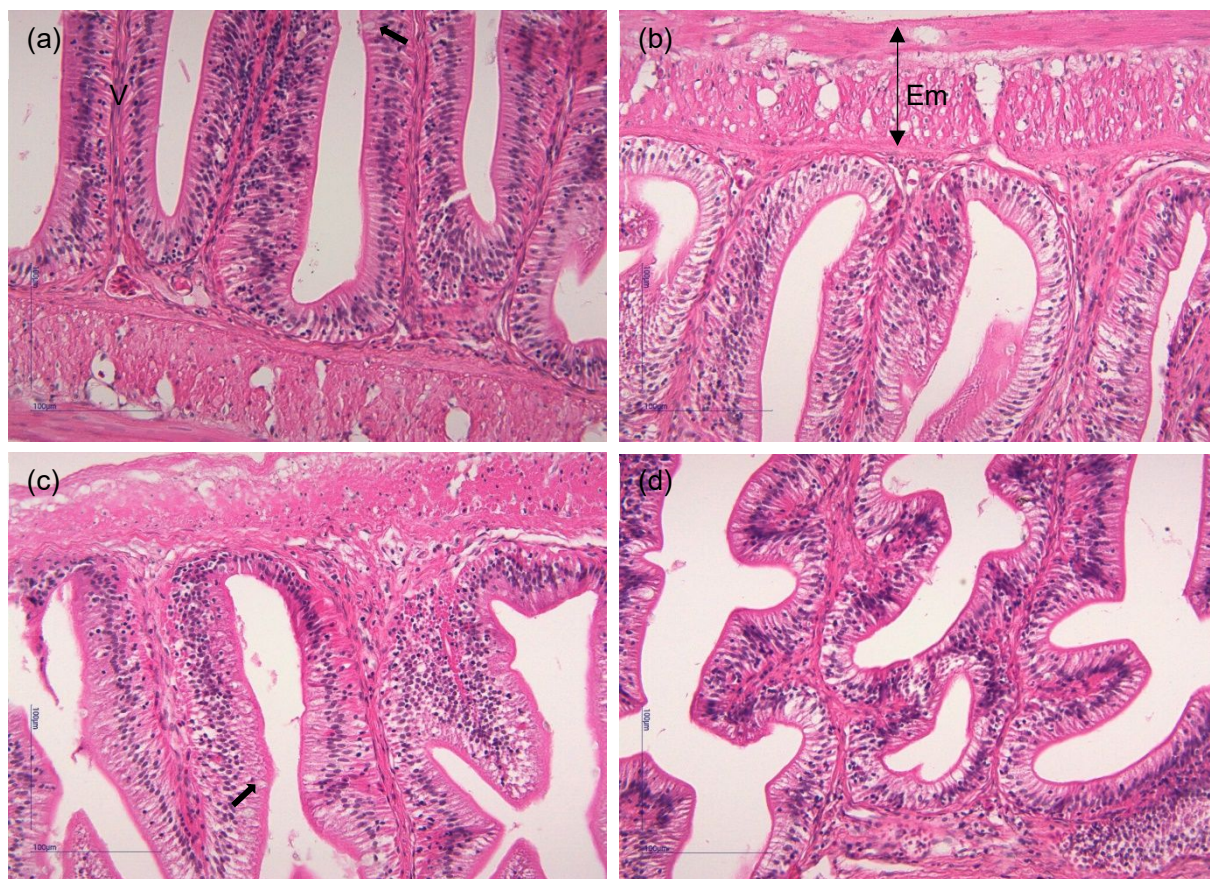


Figura 2. Histologia intestinal do segmento anterior de *Colossoma macropomum* coradas com H&E, (a) *Lactococcus lactis* 10^7 , (b) *Lactococcus lactis* 10^9 , (c) *Pediococcus pentosaceus* 10^7 , (d) *Pediococcus pentosaceus* 10^9 . (V) vilosidade, (Em) espessura muscular, (seta) célula caliciforme.

3.8 Análise da composição microbiana intestinal

A adição das cepas com potencial probiótico à ração na concentração 10^7 e 10^9 UFC g⁻¹ modulou a microbiota intestinal dos tambaquis (Figura 3). Em termos de números de sequências de DNA encontradas, os animais que receberam alimentação contendo as duas concentrações de *L. lactis* apresentaram aumento na quantidade de sequências e os animais alimentados com as duas concentrações de *P. pentosaceus* apresentaram diminuição em comparação com o grupo controle. Em nível de Filo, houve aumento na quantidade de Fusobacteria nos animais alimentados com as duas concentrações de *L. lactis* e com a maior concentração de *P. pentosaceus*, já em comparação com o Filo Firmicutes, houve uma diminuição nas duas concentrações de *L. lactis* e aumento nos animais alimentados com *P. pentosaceus* na concentração de 10^7 UFC g⁻¹. Em nível de espécie, a principal encontrada foi *Cetobacterium somerae*, seguida por *Helicobacter* sp. e *Enterobacteriaceae bacterium*.

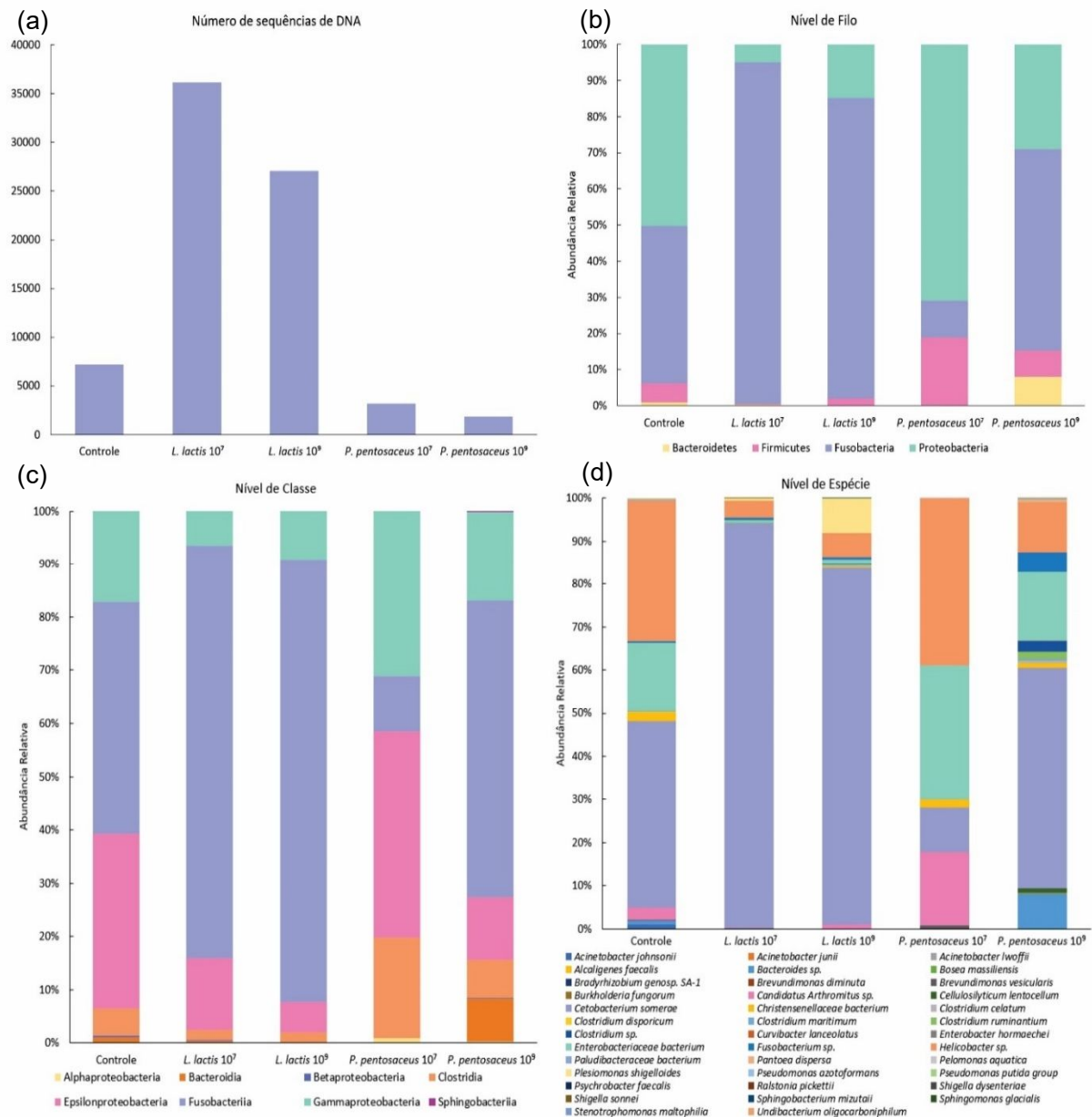


Figura 3. Análise da composição microbiana intestinal do *Colossoma macropomum* após 58 dias de alimentação com as dietas Controle, *Lactococcus lactis* 10^7 UFC g⁻¹, *Lactococcus lactis* 10^9 UFC g⁻¹, *Pediococcus pentosaceus* 10^7 UFC g⁻¹ e *Pediococcus pentosaceus* 10^9 UFC g⁻¹, gráfico (a): quantificação do número de sequencias de DNA encontradas por tratamento, (b): porcentagens encontradas em nível de Filo, (c) em nível de Classe, (d) em nível de espécie.

4 Discussão

Atualmente, um dos principais objetivos da produção aquícola é a manipulação nutricional, junto a esta prática, a manipulação da microbiota intestinal se tornou

fundamental para atender as necessidades do setor (Egerton et al., 2018). A utilização de probióticos é uma das melhores alternativas para modulação da microbiota intestinal, que além de melhorar a saúde geral do hospedeiro, o prepara para enfrentar microrganismos patogênicos através de suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (Chauhan e Singh, 2019).

As cepas utilizadas neste trabalho, *Lactococcus lactis* e *Pediococcus pentosaceus* são exemplos de microrganismos ácido lácticos com potencial probiótico que já foram amplamente utilizados na aquicultura. Apesar de Khemariya et al. (2017) afirmarem que a presença de *L. lactis* em humanos e animais é acidental, por não serem encontrados em número significativo em suas fezes, entretanto, em animais produzidos na aquicultura, esta bactéria já foi amplamente isolada e utilizada na alimentação.

Por exemplo, Feng et al. (2019) isolaram *L. lactis* de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e as alimentaram durante oito semanas com uma concentração de 5×10^8 UFC g^{-1} , obtendo melhora no desempenho produtivo, modulação de imunidade inata e resistência contra doenças. Para o linguado verde-oliva (*Paralichthys olivaceus*) a utilização de *L. lactis* na concentração de 10^8 UFC g^{-1} de ração durante cinco semanas, aumentou a taxa de crescimento, os parâmetros imunológicos não específicos e a suplementação atrasou a mortalidade de 80% dos animais em três dias comparado ao controle em desafio contra *Streptococcus iniae* (Heo et al., 2013). El-Bouhy et al. (2021) utilizaram *L. lactis* nas concentrações 10^9 e 10^{10} UFC g^{-1} de ração por 60 dias para melhorar a toxicidade do mercúrio e como estimulante imunológico para bagre Africano (*Clarias gariepinus*).

A espécie *P. pentosaceus* também já foi bem descrita como probiótico para aquicultura, como Adel et al. (2017) que alimentaram camarões-brancos-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) com concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC g^{-1} de *P. pentosaceus* na ração durante oito semanas e os resultados demonstraram melhora no desempenho produtivo, atividade de enzimas digestivas, imunidade e tolerância ao *Vibrio anguillarum*. Para a carpa comum (*C. carpio*) Ahmadifar et al. (2020) adicionaram *P. pentosaceus* nas concentrações 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC g^{-1} de ração e após 45 dias observaram melhora no desempenho produtivo, atividade de enzimas digestivas e nas respostas hematoimunológicas. A mesma bactéria também foi

estudada em bijupirá (*Rachycentron canadum*) por Xing et al. (2013), que alimentaram os animais por duas semanas com ração suplementada com a bactéria (10^9 UFC g⁻¹) e observaram respostas positivas na taxa de crescimento, no aumento da explosão respiratória dos leucócitos e maior sobrevivência após desafio contra *Photobacterium damsela*.

Apesar dos resultados promissores obtidos com a suplementação com probióticos para diferentes espécies aquáticas, a microbiota intestinal depende também de outros fatores como, múltiplas interações da espécie hospedeira-microrganismo endógeno, genética, estágio de desenvolvimento, dieta, ambiente e sexo (Piazzon et al., 2019; Piazzon et al., 2020).

A suplementação com as cepas *L. lactis* e *P. pentosaceus* para tambaquis saudáveis, nas concentrações 10^7 e 10^9 UFC g⁻¹ por 58 dias não melhoraram as respostas hematológicas (hematócrito, hemoglobina, RBC, VCM, HCM, CHCM, contagem total e diferencial dos leucócitos), bioquímicas (proteínas totais, albumina, globulina, A:G, ALT e AST) e imunológicas (complemento, lisozima, e burst), também não alteraram o índice hepatossomático, o desempenho produtivo e a resistência à infecção contra *Aeromonas hydrophila*.

Corroborando com os resultados encontrados, Paixão et al. (2017) que alimentaram tambaquis com *Bacillus subtilis* alóctone na concentração de 10^9 UFC g⁻¹ de ração durante 90 dias e desafiaram os animais em outro experimento com a mesma concentração bacteriana após alimentação por 60 dias, e eles não observaram diferenças em nenhum dos parâmetros analisados (desempenho produtivo, composição corporal e respostas hematológicas). Porém, quando utilizou uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* nas mesmas condições, eles obtiveram melhorias nos parâmetros hematológicos.

Ainda Ferreira et al. (2014) utilizaram um mix de *Bacillus* comercial (*B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. pumilus*) na alimentação de tambaquis durante 60 dias e também na água de transporte, e não observaram influência da dieta no comprimento intestinal e nas características morfohistológicas da mucosa.

Em contrapartida, Dias et al. (2018) ao alimentarem tambaquis durante 120 dias com *B. cereus* autóctone com diferentes concentrações (10^4 , 10^6 e 10^8 UFC g⁻¹), a partir de 60 dias já observaram aumento significativo no ganho de peso e

produtividade e após 120 dias observaram aumento no número de eritrócitos, sendo que a maior concentração (10^8 UFC g⁻¹) também aumentou o valor de hematócrito e proteínas totais.

Azevedo et al. (2016) utilizaram uma cepa de *B. subtilis* alóctone (o preparado de cepas continha 1×10^{10} UFC g⁻¹ de produto e foi utilizado 2 g Kg⁻¹ de ração), na alimentação do tambaqui durante oito semanas e observaram melhora na taxa de crescimento, aumento na utilização de alimento e nos parâmetros econômicos avaliados.

Santos et al. (2021) utilizaram *B. subtilis* na concentração 4×10^8 células mL⁻¹ na água de um sistema de bioflocos durante 60 dias e observaram melhora no fator de condição dos animais.

Na análise histoquímica intestinal deste estudo, foi observado um aumento no número de células caliciformes e na intensidade de secreção de muco substâncias neutras na região posterior do intestino dos animais alimentados com as duas concentrações de *L. lactis*, enquanto que para os animais alimentados com dieta suplementada com *P. pentosaceus* houve diminuição das células caliciformes na região anterior e média, com diminuição da intensidade de secreção de muco substâncias. Este aumento e diminuição de células e produção de muco pode estar relacionado com o número de sequências de DNA encontrados na análise de metagenômica dos intestinos, pois o muco que recobre a parede intestinal, acomoda uma grande parte da microbiota e é local de fixação de microrganismos, sejam eles probióticos, comensais ou patogênicos (Celebioglu e Svensson, 2018).

Para compreender totalmente a necessidade de modulação da microbiota intestinal do tambaqui, é essencial estudos sobre a composição e o papel da microbiota no crescimento e na saúde desta espécie tão importante para a aquicultura brasileira.

Ao analisar a composição bacteriana do intestino do tambaqui neste estudo, pode-se observar que os filos mais abundantes foram Fusobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Estes filos representam mais de 90 % da microbiota intestinal de várias espécies de peixes de água doce e marinhos (Ringo et al., 2016) e estão envolvidos em importantes funções no organismo dos peixes, como digestão, absorção de nutrientes e resposta imune (Ghanbari et al., 2015). Estes Filos também

já foram descritos em tambaquis com adição do Filo Actinobacteria (Sylvain et al., 2016), em pirarucu (*Arapaima gigas*) (Pereira et al., 2017) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) com adição de Actinobacteria, Spirochaetas e Cyanobacteria (Castañeda-Monsalve et al., 2019), em proporções diferentes porém fazendo parte dos principais Filos encontrados em peixes de água doce. Proteobacteria, Firmicutes e Fusobacteria são relacionados ao processo digestivo em peixes, contribuindo com enzimas e substratos (Smriga et al., 2010).

As espécies utilizadas como probióticos neste estudo não foram encontradas na composição microbiana intestinal através de análise metagenômica, portanto, não foram capazes de se fixar na parede intestinal do hospedeiro, fazendo parte apenas da microbiota alóctone. Porém, foram capazes de modular a microbiota autóctone, uma vez que as bactérias ingeridas podem ser benéficas enquanto estão no intestino, mas não têm um efeito duradouro e o consumo contínuo de probióticos é necessário para um impacto sustentado (Moroni et al., 2021).

As cepas de *L. lactis* por exemplo diminuíram a presença do Filo Firmicutes, provavelmente através da produção de nisina (um composto antimicrobiano), que apresenta grande atividade principalmente contra bactérias Gram-positivas, sendo estas a maioria constituinte deste gênero (Li et al., 2018; Moroni et al., 2021). Já os animais tratados com as cepas de *P. pentosaceus* apresentaram maior quantidade de bactérias do Filo Firmicutes. Este Filo em maior quantidade em relação ao Bacteroidetes foi descrito em peixes podendo ser um fator que contribui para melhora do desempenho produtivo (Li et al., 2013).

A espécie mais encontrada em todos os grupos, menos no grupo alimentado com ração suplementada com *P. pentosaceus* 10^7 foi a *Cetobacterium somerae*. Esta espécie está relacionada a produção de vitamina B12 no intestino de peixes de água doce, desta forma não necessitam de suplementação vitamínica (Sugita et al., 1991). Outros estudos também encontram este gênero como o mais abundante no intestino do pirarucu (Ramírez et al., 2018; Pereira et al., 2017), pirapitinga (Castañeda-Monsalve et al., 2019), achigã (*Micropterus salmoides*) (Zhou et al., 2018) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Adeoye et al., 2016).

Apesar da abundância relativa, a baixa quantidade de espécies encontradas neste trabalho, (Controle = 19, *L. lactis* 10^7 = 12, *L. lactis* 10^9 = 19, *P. pentosaceus* 10^7

= 9, *P. pentosaceus* 10^9 = 21) pode ser considerada ruim, pois há menor competição entre as espécies autóctones contra patógenos oportunistas e invasores, podendo colonizar o trato intestinal mais facilmente (Moroni et al., 2021; Rimoldi et al., 2020; Apper et al., 2016).

Podemos concluir que as cepas *L. lactis* e *P. pentosaceus* utilizadas neste trabalho não colonizaram o intestino do hospedeiro. Contudo, foram capazes de modular a microbiota intestinal dos tambaquis. Porém, esta modulação não foi suficiente para melhorar parâmetros como hematoimunologia, desempenho produtivo e resistência contra *A. hydrophila*.

5 Referências

Abreu, J.S., Marzocchi-Machado, C.M., Urbaczek, A.C., Fonseca, L.M. and Urbinati, E.C. (2009) Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Biol.* **69**, 1133-1139. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000500018>.

Adel M., Yeganeh S., Dawood M.A.O., Safari R., and Radhakrishnan, S. (2017) Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* **23**, 1401-1409. <https://doi.org/10.1111/anu.12515>.

Adeoye, A.A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D.L. and 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>.

Ahmadifar, E., Sadegh, T.H., Dawood, M.A.O., Dadar, M. and Sheikhzadeh, N. (2020) The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*. **516**, 734656. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734656>.

Alonso, S., Castro, M.C., Berdasco, M., Banda, I.G., Moreno-Ventas X. and Rojas, A.H. (2019) Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture. *Probiotics Antimicrob Proteins*. **11**, 569-579. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9439-2>.

Apper, E., Weissman, D., Respondek, F., Guyonvarch, A., Baron, F., Boisot, P., Rodiles, A. and Merrifield, D.L. (2016) Hydrolysed wheat gluten as part of a diet based on animal and plant proteins supports good growth performance of Asian seabass

(*Lates calcarifer*), without impairing intestinal morphology or microbiota. *Aquaculture* **453**, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.018>.

Azevedo, R.V., Fosse Filho, J.C., Pereira, S.L., Cardoso, L.D., Vidal Júnior, M.V., and Andrade, D.R. (2016) Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **51**, 9-16. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000100002>.

Banerjee, G. and Ray, A.K. (2017) The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* **115**, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>.

Behmer, A.O., Talosa, C.M.E. and Neto, F.G.A. (1976) Manual De Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. EDART. Edit.

Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Saita, M.V., Gimbo, R.Y. and Urbinati, E.C. (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>.

Castañeda-Monsalve, V.A., Junca, H., García-Bonilla, E., Montoya-Campuzano, O.I. and Moreno-Herrera, C.X. (2019) Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachypomus*). *Aquaculture*. **512**, 734325. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734325>.

Celebioglu, H.U. and Svensson, B. (2018) Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells. *Microorganisms*. **6**, 90. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030090>

Chauhan, A. and Singh, R. (2019) Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis* **77**, 99-113. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0580-1>

Chen, S.W., Liu, C.H. and Hu, S.Y. (2019) Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* **84**, 695-703. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.059>.

Collier, H.B. (1944) The standardization of blood hemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.* **50**, 550-552.

Dias, J.A.R., Abe, H.A., Sousa, N.C., Couto, M.V.S., Cordeiro, C.A.M., Meneses, J.O., Cunha, F.S., Mourão J.L.P., Martins M.L., Barbas, L.A.L., Carneiro, P.C.F., Maria, A.N. and Fujimoto, R.Y. (2018) Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.* **49**, 3063-3070. <https://doi.org/10.1111/are.13767>.

Egerton S., Culloty S., Whooley J., Stanton, C. and Ross, R.P. (2018) The Gut Microbiota of Marine Fish. *Front. Microbiol.* **9**, 873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>.

El-Bouhy, Z.M., Reda, R.M., Mahboub, H.H. and Gomaa, F.N. (2021) Chelation of mercury intoxication and testing different protective aspects of *Lactococcus lactis* probiotic in African catfish. *Aquac. Res.* **00**, 1–14. <https://doi.org/10.1111/are.15227>.

Ellis, A.E. (1990) Lysozyme Assays. In: Stolen J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., Muiswinkel, W. B., (eds) Techniques in fish immunology. pp 101-103. Sos Publications.

Feng, J., Chang, X., Zhang, Y., Yan, X., Zhang, J. and Nie, G. (2019) Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* **93**, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.028>.

Ferreira, C.M., Antoniassi, N.A.B., Silva, F.G., Povh, J.A., Potência, A., Moraes, T.C.H., Silva, T.K.S.T. and Abreu, J.S. (2014) Características histomorfométricas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. *Pesq. Vet. Bras.* **34**, 1258-1264. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200020>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. (2002) Report of a joint FAO/WHO working group on drafting. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 2002 April 30.

Gallania, S.U., Valladão, G.M.R., Assane, I.M., Alves, L.O., Kotzent, S., Hashimoto, D.T. and Pilarski, F. (2020a) Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. *Microb. Pathog.* **149**, 104512. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512>.

Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, K.J. (2015) A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture.* **448**, 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. and Brosious, E. (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *Am. J. Clin. Pathol.* **56**, 35-39. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>.

Heo, W.S., Kim, Y.R., Kim, E.Y., Bai, S.C. and Kong, I.S. (2013) Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. **376-379**, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.009>.

Khemariya, P., Singh, S., Nath, G. and Gulati, A.K. (2017) Probiotic *Lactococcus lactis*: A Review. *TURJAF*. **5**, 556-562. Doi: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i6.556-562.690>.

Kotzent, S., Gallani, S.U., Valladão, G.M.R., Alves, L.O. and Pilarski, F., 2021. Probiotic potential of autochthonous bacteria from tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.* **52**, 2266-2275. <https://doi.org/10.1111/are.15078>.

Li, X., Yan, Q., Xie, S., Hu, W., Yu, Y. and Hu, Z. (2013) Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Plos One*. **8**, e64577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064577>

Li Q., Montalban-Lopez, M. and Kuipers, O.P. (2018) Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against Gram-negative pathogens. *Appl Environ Microbiol.* **84**, e00052-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00052-18>.

Liu, X., Steele, J.C. and Meng, X.Z. (2017) Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. *Environ Pollut.* **223**, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.003>.

Moroni, F., Naya-Català, F., Piazzon, M.C., Rimoldi, S., Caldach-Giner, J., Giardini, A., Martínez, I., Brambilla, F., Pérez-Sánchez, J. and Terova, G. (2021) the effects of nisin-producing *Lactococcus lactis* Strain Used as Probiotic on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, gut microbiota, and transcriptional response. *Front. Mar. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.659519>.

Paixão, A.E.M., Santos, J.C., Pinto, M.S., Pereira, D.S.P., Ramos, C.E.C.O., Cerqueira, R.B., Navarro, R.D. and Silva, R.F. (2017) Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquac Int.* **25**, 2035-2045. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0173-7>.

Pereira, G.V., Cunha, D.G., Mourino, J.L.P., Rodiles, A., Jaramillo-Torres, A. and Merrifield, D.L. (2017) Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and

isolation of potential probiotic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **123**, 1298-1311. <https://doi.org/10.1111/jam.13572>.

Piazzon, M.C., Naya-Català, F., Simó-Mirabet, P., Picard-Sánchez, A, Roig, F.J., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A. and Pérez-Sánchez, J. (2019) Sex, age, and bacteria: How the intestinal microbiota is modulated in a protandrous hermaphrodite fish. *Front. Microbiol.* **10**, 2512. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02512>.

Piazzon, M.C., Naya-català, F., Perera, E., Palenzuela, O., Sitjà-bobadilla, A. and Pérez-Sánchez, J. (2020) Genetic selection for growth drives differences in intestinal microbiota composition and parasite disease resistance in gilthead sea bream. *Microbiome* **8**,168. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00922-w>.

Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A. and 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>.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M. and Egami, M.I. (2013) Métodos para análise hematológica em peixes. pp. 166. SciELO – EDUEM.

Rasmussen-Ivey, C.R., Hossain, M.J., Odom, S.E., Terhune, J.S., Hemstreet, W.G., Shoemaker, C.A., Zhang, D., Xu, D., Griffin, M.J., Liu, Y., Figueras, M.J., Santos, S.R., Newton, J.C. and Liles M.R. (2016) Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes. *Front. Microbiol.* **7**, 1615. [10.3389/fmicb.2016.01615](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01615).

Rimoldi, S., Gini, E., Koch, J.F.A., Iannini, F., Brambilla, F. and Terova, G. (2020) Effects of hydrolyzed fish protein and autolyzed yeast as substitutes of fishmeal in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet, on fish intestinal microbiome. *BMC Vet Res.* **16**, 118. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02335-1>.

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

Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S.H., Soltani, M., Hoseinifar, S.H., Harikrishnan, R. and Song S.K. (2020) Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* **129**, 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>.

Santos, D.K.M., Kojima, J.T., Santana, T.M., Castro, D.P., Serra, P.T., Dantas, N.S.M., Fonseca, F.A.L., Mariúba, L.A.M. and Gonçalves, L.U. (2021) Farming tambaqui

(*Colossoma macropomum*) in static clear water versus a biofloc system with or without *Bacillus subtilis* supplementation. *Aquacult Int.* **29**, 207-218. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00618-w>.

Smriga, S., Sandin, S.A. and Azam, F. (2010) Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 31-42, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00879.x>.

Sugita, H., Miyajima, C. and 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).

Sylvain, F.É., Cheaib, B., Llewellyn, M., Correia, T.G., Fagundes, D.B., Val, A.L. and Derome, N. (2016). pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Sci Rep.* **6**, 32032. <https://doi.org/10.1038/srep32032>.

Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R. (2006) Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Byconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **38**, 209-215.

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U. and Pilarski, F. (2018) South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquacult.* **10**, 351-369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 655-671. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000>.

Wintrobe, M.M. (1934) Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* **51**, 32-49.

Woynárovich, A. and Van Anrooy, R. (2019) Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624. pp.132. Rome, FAO.

Xing, C.F., Hu, H.H., Huang, J.B., Fang, H.C., Kai, Y.H., Wu, Y.C. and Chi, S.C. (2013) Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. *Fish Shellfish Immunol.* **35**, 1122-1128. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.021>.

Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C., Rise, M.L., Hall, J.R., Nash, G.W. and 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>.

Zanuzzo, F.S., Sabioni, R.E., Montoya, L.N.F., Favero, G. and 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 Immunol.* **65**, 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.013>.

Zhou, M., Liang, R., Mo, J., Yang, S., Gu, N., Wu, Z., Babu, S., Li, J., Huang, Y. and Lin, L. (2018) Effects of brewer's yeast hydrolysate on the growth performance and the intestinal bacterial diversity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* **484**, 139-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.006>.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

O presente estudo abordou a utilização de cepas potencialmente probióticas na alimentação de tambaquis: *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus hominis*. Os isolados foram investigados quanto ao efeito na saúde de tambaquis suplementados em diferentes concentrações: 10^6 UFC/g de ração no primeiro experimento e 10^7 e 10^9 UFC/g de ração no segundo experimento. Apesar de alterações dos parâmetros de ALT, AST e burst dentro do tempo de 60 e alteração na composição microbiana intestinal no tempo de 58 dias, nenhuma alteração foi suficiente para constatar o efeito imunomodulatório ou imunoestimulante dos potenciais probióticos nesta espécie. Conforme citado ao longo do trabalho, outros estudos também analisaram a eficiência de probióticos para este peixe e muitos encontraram resultados diferentes do esperado, quando comparados com outras espécies. Geralmente os trabalhos que abordam a utilização de probióticos relatam melhora em diversos parâmetros em tempos menores que 60 dias, para o tambaqui, os trabalhos que apresentam resultados positivos precisaram de mais tempo.

Trabalhos devem ser desenvolvidos para a compreensão do tempo necessário para melhorar a resposta imune do tambaqui por cepas probióticas, análises mais específicas sobre a microbiota deste hospedeiro também podem contribuir para melhorar a produção desta espécie.