

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/07/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO:
HEMATOIMUNOLOGIA, DESEMPENHO PRODUTIVO E
SOBREVIVÊNCIA DO TAMBACUI (*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 (*Colossoma macropomum*) / 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. *Colossoma macropomum*. 2. *Enterococcus hirae*. 3. *Lactococcus lactis*. 4. *Pediococcus pentosaceus*. 5. *Staphylococcus hominis*. 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



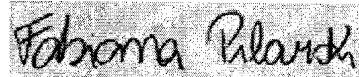
Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)

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. cursou 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 Sílvia 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 Prof^o 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 Tabaqui: 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).

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-Zarzuola 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 bacteriocin-producing *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, hominicin, 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

Wojnárovich 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 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.