



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Maria Clara Miguel Libanori

Efeitos da suplementação dietética de diferentes concentrações do ácido orgânico benzoico na alimentação de tilápia-do-nilo e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

Florianópolis

2021

Maria Clara Miguel Libanori

Efeitos da suplementação dietética de diferentes concentrações do ácido orgânico benzoico na alimentação de tilápia-do-nilo e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.
Coorientadora: Prof^a. Scheila Anelise Pereira, Dr^a.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Libanori, Maria Clara Miguel

Efeitos da suplementação dietética de diferentes concentrações do ácido orgânico benzoico na alimentação de tilápia-do-nylo e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* / Maria Clara Miguel Libanori ; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño, coorientadora, Scheila Anelise Pereira, 2021.

p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Resistência a doenças. 3. Sobrevivência. 4. Aditivo alimentar. 5. Sistema imunológico. I. Mouriño, José Luiz Pedreira. II. Pereira, Scheila Anelise. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Maria Clara Miguel Libanori

Efeitos da suplementação dietética de diferentes concentrações do ácido orgânico benzoico na alimentação de tilápia-do-nilo e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Andrade Rodrigues, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Bruno Corrêa da Silva, Dr.
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marilda e Edson.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meu caminho.

Aos meus pais, Marilda e Edson, que me apoiam incondicionalmente e me deram todas as oportunidades para que eu conseguisse estar aqui hoje. Além de toda a minha família pelos pensamentos positivos e incentivos. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, pela orientação, apoio e motivação durante esses anos e confiança no meu trabalho.

Ao professor Maurício Laterça Martins, por todo o auxílio dado, pelas conversas e incentivos.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, ao Carlito que sempre ajudou com tudo que pode e com muita paciência para resolver os problemas, e aos professores que tive a oportunidade de conhecer.

À Scheila, minha coorientadora e amiga. Muito obrigada pelo acolhimento, pela paciência que sempre teve (não sei como), por me ensinar a mesma coisa várias vezes. Muito obrigada por acreditar em mim, me aconselhar e acalmar sempre, percebi que o desespero não leva a nada e sempre tem algo bom por vir. Aprendi muito além do ambiente acadêmico com você, que vou levar para a vida.

À Graci, minha parceira de mestrado, que se tornou uma grande amiga. Obrigada por sempre estar junto comigo, por dividir meus medos, minhas inseguranças, por me fazer companhia nos meus plantões nos finais de semana, por levar várias comidinhas, por toda as ajudas, por tudo que passamos. Conseguimos, Gra!!!

Aos amigos que fiz no laboratório AQUOS, muito obrigada por me receberem tão bem, todos estão no meu coração. Obrigada pelo conhecimento dividido e por toda a ajuda que me ofereceram, além dos momentos de descontração, dos cafês e almoços. E aos que me ajudaram durante o experimento, Tami, Lúvia, Marco, Gaúcho, Matheus, Zezinho, Lucas, César, Sílvia. Além do Juliano, Vânia e André que trabalham no NEPAQ. Sem vocês nunca conseguiria realizar o experimento do início ao fim.

Em especial aos que me ajudaram fora do laboratório nesse momento tão estranho que estamos vivendo. À Keke, muito obrigada por ter me adotado aqui, por confiar em mim, por todos os conselhos e conversas sobre a vida. Ao Domi, por toda sua disponibilidade em ajudar, por estar sempre presente e pelos melhores conselhos sempre. E também à Paula, pelas risadas, conversas e mais conversas, músicas divididas, além de toda a ajuda no laboratório.

Ao meu professor da graduação, Paulo Fernandes Marcusso, que desde o terceiro ano de faculdade me ajudou em tudo que precisei e continua ajudando. E por isso eu estou aqui hoje.

Às bonitas que moram comigo, Bruna e Raíssa, muito obrigada por terem me aguentado de mal humor, por lerem minhas coisas mil vezes, pelas conversas sérias quando foi preciso, por tudo que passamos aqui. Vocês com certeza tornaram esses dois anos muito mais leves.

Às minhas irmãs da vida, Amanda e Júlia, que desde a infância estiveram comigo. Crescemos juntas, comemorando cada vitória uma da outra e mesmo longe, sempre me incentivaram e torceram por mim.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil – (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Também à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), à empresa DSM e ao Laboratório de Bacteriologia em Peixes (LABBEP).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação dietética com ácido orgânico benzoico em diferentes concentrações sobre juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Foram avaliados o desempenho de crescimento, parâmetros hemato-imunológicos e sobrevivência após desafio via gavagem com *Streptococcus agalactiae*. Um total de 320 juvenis foram divididos em 16 tanques, com volume útil de 70 litros, em quatro grupos, em quadruplicada, de acordo com as concentrações de inclusão de ácido benzoico pulverizado em dietas previamente formuladas para atender às necessidades nutricionais das espécies. À saber: grupo controle sem inclusão (Controle_{0%}); peixes alimentados com dieta suplementada com ácido benzoico 0,1% (AB_{0,1%}); peixes alimentados com dieta suplementada com ácido benzoico 0,2% (AB_{0,2%}) e peixes alimentados com dieta suplementada com ácido benzoico 0,3% (AB_{0,3%}) por 54 dias. Os peixes alimentados com AB_{0,1%} apresentaram melhores resultados em ganho de peso ($51,01\text{g} \pm 3,40$), biomassa final ($1040,88 \pm 79,40$), taxa de crescimento específico ($4,18 \pm 0,05$), conversão alimentar ($1,38 \pm 0,03$), peso médio final ($56,96\text{g} \pm 3,60$) e no ganho de biomassa ($922,15 \pm 58,21$) quando comparado ao grupo controle. Os peixes alimentados com AB_{0,1%} ainda apresentaram maior percentual de sobrevivência (59%) após exposição a *S. agalactiae*. Os peixes alimentados com AB_{0,1%} apresentaram valores elevados de hemoglobina ($9,31 \pm 1,14$), leucócitos ($3,45 \pm 0,48$) e linfócitos ($285,00 \pm 40,90$) em relação aos demais tratamentos, antes da infecção experimental. Proteína total e imunoglobulina total aumentaram em peixes suplementados com ácido benzoico a 0,1% pré-expostos a infecção experimental com a *S. agalactiae*. Esses resultados sugerem que a adição de ácido benzoico na concentração a 0,1% na dieta da tilápia-do-nylo melhora o desempenho de crescimento, os parâmetros hematoimunológicos e a sobrevivência.

Palavras-chave: Aquicultura. Resistência a doenças. Sobrevivência. Aditivo alimentar. Sistema imunológico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of dietary supplementation with benzoic organic acid in different concentrations on juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Was evaluated the growth performance, hemato-immunological parameters and survival after challenge via gavage with *Streptococcus agalactiae*. A total of 320 juvenile fish were divided into 16 tanks were divided into four groups according to the concentrations of inclusion of benzoic acid sprayed in diets previously formulated to meet the nutritional requirements of the species. Namely control group without inclusion (Control_{0%}); fish fed diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA_{0.1%}); fish fed diet supplemented with 0.2% (BA_{0.2%}) benzoic acid and fish fed diet supplemented with 0.3% (BA_{0.3%}) benzoic acid for 54 days. Four replicates were included per treatment. The fish fed with BA_{0.1%} showed better results in weight gain ($51.01\text{g} \pm 3.40$), final biomass (1040.88 ± 79.40), specific growth rate (4.18 ± 0.05), food conversion (1.38 ± 0.03), end mean weight ($56.96\text{g} \pm 3.60$) and in biomass gain (922.15 ± 58.21) when compared to the control group. The fish fed with BA_{0.1%} still showed higher percentage of survival (59%) after exposure to the pathogen. Fish fed BA_{0.1%} presented high hemoglobin values (9.31 ± 1.14), leukocytes (3.45 ± 0.48) and lymphocytes (285.00 ± 40.90) in relation to other treatments, before exposure. Total protein and total immunoglobulin, increased in fish supplemented with 0.1% benzoic acid pre-exposed experimental infection with *S. agalactiae*. These results suggest that the addition of benzoic acid supplemented at 0.1% in the Nile tilapia diet improved the growth performance, hemato-immunological parameters and survival.

Key words: Aquaculture. Disease resistance. Survival. Feed additive. Immune system.

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

- Figure 1: Mortality curve of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged with (CP018623) in concentrations of 1×10^8 e 1×10^9 (UFC mL⁻¹) via gavage and intraperitoneal to calculate the lethal dose 37
- Figure 2: Mortality of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* 54 days after feeding with diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA_{0.1%}), 0.2% benzoic acid (BA_{0.2%}), 0.3 benzoic acid (BA_{0.3%}) or not supplemented (control_{0%}), and followed by an experimental challenge with *Streptococcus agalactiae* (1×10^9 CFU mL⁻¹) via gavage. Data are presented as mean \pm standard deviation. * Different letters indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$)..... 41

LISTA DE QUADROS CAPÍTULO 1

Quadro 1: Efeitos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal.*	18
---	----

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2

Table 1:	Formulation and analysis of the proximate composition (dry matter) of the base diet used in the experiment.....	32
Table 2:	Minimum inhibitory concentration (MIC) of the test solutions against <i>Streptococcus agalactiae</i> in the concentration 1×10^9 colony-forming units (CFU mL ⁻¹). Data presented as means \pm standard deviation for each substance. For the antibiotic Azithromycin the result is expressed in concentration (mg mL ⁻¹) \pm standard deviation for each substance. For the antibiotic Azithromycin.....	Erro! Indicador não definido. 39
Table 3:	Zootechnical performance of Nile tilapia fed diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA _{0.1%}), 0.2% benzoic acid (AB _{0.2%}), 0.3% benzoic acid (BA _{0.3%}) or not supplemented (control _{0%}) for 54 days. Data presented as means \pm standard deviation.*	38
Table 4:	Hematological parameters of Nile tilapia fed diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA _{0.1%}), 0.2% benzoic acid (BA _{0.2%}), 0.3% benzoic acid (BA _{0.3%}) or not supplemented (control _{0%}) for 54 days. Data presented as means \pm standard deviation.*	39
Table 5:	Immunological parameters pre and post-exposure with <i>Streptococcus agalactiae</i> via gavage in Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> after 54 days of feeding with a diet supplemented with benzoic acid 0.1% (AB _{0.1%}), benzoic acid 0.2% (AB _{0.2%}), benzoic acid 0.3% (AB _{0.3%}) or unsupplemented (control _{0%}). Total plasmatic protein concentration (mg mL ⁻¹) and total plasmatic immunoglobulin concentration (mg mL ⁻¹). Data are presented as means and standard deviations, analyzed by ANOVA bifactorial.*	40
Table 6:	Immunological parameters pre and post-exposure with <i>Streptococcus agalactiae</i> via gavage in Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> after 54 days of feeding with a diet supplemented with benzoic acid 0.1% (AB _{0.1%}), benzoic acid 0.2% (AB _{0.2%}), benzoic acid 0.3% (AB _{0.3%}) or unsupplemented (control _{0%}). Title agglutination concentration (Log 2 (x+1)) and title antimicrobial concentration (Log 2 (X+1)). Data are presented as means and standard deviations, analyzed by ANOVA bifactorial.*	41

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	14
1.1	TILAPICULTURA.....	14
1.2	PRINCIPAIS ENFERMIDADES NO CULTIVO DE TILÁPIAS	15
1.3	ADITIVOS ALIMENTARES	17
1.3.1	Sais e ácidos orgânicos na piscicultura	19
a)	<i>Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos</i>	<i>19</i>
b)	<i>Principais ácidos e/ou sais orgânicos</i>	<i>20</i>
1.3.2	Influência da suplementação de ácidos orgânicos	22
a)	<i>Performance zootécnica e saúde</i>	<i>22</i>
b)	<i>Digestibilidade de nutrientes</i>	<i>22</i>
c)	<i>Sistema imunológico.....</i>	<i>23</i>
d)	<i>Comunidade microbiana</i>	<i>24</i>
1.4	OBJETIVOS	25
1.4.1	Objetivo Geral.....	25
1.4.2	Objetivos Específicos	26
1.5	ESTRUTURA DO TRABALHO	26
2	CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO	27
2.1	INTRODUCTION	29
2.2	MATERIAL AND METHODS.....	30
2.2.1	Fish, organic acid and bacterial strain	31
2.2.2	<i>In vitro</i> test and antagonism against <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	31
2.2.3	Experimental diets	32
2.2.4	Experimental design	33
2.2.5	Zootechnical indices	34
2.2.6	Hematological analysis	34
2.2.7	Immunological analysis.....	35
2.2.8	<i>Streptococcus agalactiae</i> challenge	36
2.2.9	Statistical analysis.....	37
2.3	RESULTS.....	37
2.3.1	<i>In vitro</i> test antagonism against <i>S. agalactiae</i>	37
2.3.2	Zootechnical indices	38
2.3.3	Hematological analysis	38

2.3.4	Immunological analysis.....	39
2.3.5	<i>Streptococcus agalactiae</i> challenge.....	40
2.4	DISCUSSION.....	41
2.5	CONCLUSIONS	44
2.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO CIENTÍFICO	45
3	CONCLUSÃO GERAL	49
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	51

1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 TILAPICULTURA

Dentre os segmentos da agropecuária, a piscicultura em águas continentais recebe muitos incentivos produtivos, e atualmente é o segmento que mais cresce no Brasil. Com relação as espécies de peixes produzidos em águas continentais brasileira, destaca-se a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Tal fato é evidenciado no aumento do volume exportado, onde o predomínio das tilápias representam 81% em comparação as demais espécies comercializadas no exterior. A tilápia, tem-se consolidado, portanto, como carro-chefe das exportações piscícolas brasileiras, a exemplo disso, só em 2019 o aumento do volume de exportação chegou a 19% (PEIXEBR, 2020).

As tilápias são peixes de água doce, pertencentes a família Cichlidae, foram introduzidas no Brasil no ano de 1950, sendo a primeira espécie a tilápia rendalli (*Coptodon rendalli*) (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; OLIVEIRA et al., 2007). Só em 1971, a tilápia nilótica (*O. niloticus*) foi introduzida, tornando-se a espécie mais cultivada comercialmente desde então (OLIVEIRA et al., 2007). Este fato deve-se as suas características, tais como: serem peixes tropicais, apresentarem conforto térmico entre 26 a 32°C, facilidade de reprodução e possibilidade de manipulação hormonal para obtenção de exemplares masculinos (KUBITZA; KUBITZA, 2000; MARENGONI et al., 2015)

As tilápias ainda possuem boa receptibilidade para diversos tipos de alimentos e capacidade de aproveitamento destes, o que lhe proporciona boa conversão alimentar, assim como bom crescimento em diferentes sistemas de produção intensivo. Adicionalmente, suporta manuseios intensos e condições não ideais de parâmetros de água devido a sua rusticidade, o que favorece também alta resistência a doenças. Além disso, a tilápia tem boa aceitabilidade pelo mercado consumidor devido a coloração branca da carne, ausência de espinhos intramusculares, textura firme e sabor suave (KUBITZA; KUBITZA, 2000; MARENGONI et al., 2015).

Em decorrência do aumento populacional, a demanda por proteína de origem animal, encontra-se em franco crescimento. Tal fato não seria diferente no segmento piscícola e, por isso, as produções aquícolas buscam intensificar suas atividades (CULOT; GROSSET; GAUTIER, 2019).

Dentre os sistemas de produção de tilápias no Brasil, os mais utilizados são os tanques-rede e os viveiros escavados. A produção em tanques-rede é do tipo intensivo e pode ser implantado em diferentes áreas, como rios, áreas alagadas e açudes, por exemplo e, devido a

isto, dispensa altos custos inicialmente. Nesse sistema é de extrema importância a alimentação balanceada e monitoramento da qualidade de água (TEIXEIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010). Em relação aos viveiros escavados, este utiliza água acumulada de nascentes, rios ou poços e permite acesso a alimentação natural, como os fitoplânctons. Também se faz necessário o monitoramento da qualidade de água, além do uso de aeradores serem importantes (SENAR, 2018).

Dentre os sistemas intensivos, os de recirculação estão sendo utilizados como alternativas aos sistemas tradicionais, pois comparativamente, suportam maior densidade de animais com menor impacto ambiental, em virtude do uso de sistemas de filtragem e estrutura de captação de água (AZEVEDO et al., 2014; ARUETY et al., 2015). Contudo, independente do sistema utilizado para intensificar a produção, um dos fatores que favorecem a proliferação bacteriana é o grande número de estocagem de peixes, o que pode gerar, quando não manejado adequadamente, altas concentrações de compostos orgânicos, propiciando tal ocorrência a qual pode culminar em elevada mortalidade (ARUETY et al., 2015).

1.2 PRINCIPAIS ENFERMIDADES NO CULTIVO DE TILÁPIAS

Enfermidades bacterianas são motivos de preocupações em todo o mundo, pois impõem consideráveis prejuízos econômicos ao setor (LEIRA et al., 2016a). Embora inúmeras bactérias patogênicas já tenham sido isoladas em tilápias, as mais frequentes e importantes economicamente são *Streptococcus*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare* (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011). Dentre estes microrganismos, a estreptococose é a doença que possui diversos hospedeiros, sendo patogênica para mamíferos, répteis, anfíbios e peixes (EVANS et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2006).

Estreptococose é a designação dada para doenças septicêmicas originadas de bactérias cocos Gram positivos, dentre eles encontram-se os gêneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Carnobacterium*. A estreptococose foi caracterizada primeiramente em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) no ano de 1956, no Japão (LEIRA et al., 2016^b). No Brasil, o primeiro relato em peixes ocorreu no Norte do Paraná em 2003. Mais tarde também foram descritas em tilapiculturas nos estados de São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia e Ceará (LEIRA et al., 2016b).

A estreptococose causada pelo gênero *Streptococcus*, que são bactérias de 0,5 a 2,0 µm de diâmetro, apresentam-se em pares ou em cadeias lineares curtas, são catalase negativa, não móveis, não formadores de esporos e anaeróbicos facultativos. Para a

caracterização das espécies, são utilizados ainda o tipo de hemólise e sorotipagem baseada na antigenicidade de polissacarídeos capsulares (LEIRA et al., 2016b).

Na produção aquícola, os agentes patogênicos *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Tal fato pode estar relacionado, principalmente, pelas condições de estresse ocasionadas por: alta densidade de estocagem, má qualidade da água, exposição a temperaturas inadequadas que culminam na baixa de imunidade e leva a susceptibilidade a septicemia e meningoencefalite nos peixes, que conseqüentemente, podem gerar grandes perdas econômicas para a indústria (MIAN et al., 2020).

Dentre os agentes patogênicos previamente citados, a tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) é acometida principalmente pela *S. agalactiae*, devido em partes, a transmissão horizontal através da propagação fecal (MIAN et al., 2020). Esta enfermidade é caracterizada por causar septicemia, exoftalmia e meningoencefalite, além de causar doenças desde agudas e crônica nos peixes acometidos, tendo como consequência grande mortalidade, principalmente no verão, quando a temperatura está mais alta (CHIDEROLI et al., 2017).

Além disso, em decorrência de muitos fatores, tem-se observado o aumento de sua ocorrência em diferentes regiões do Brasil, sendo, portanto, considerado um patógeno emergente para peixes marinhos e/ou de água doce (FIGUEIREDO et al., 2006, LEIRA et al., 2017). Ademais, a *S. agalactiae* apresenta diferentes soro tipos, os quais são subdivididos em Ia, Ib e III. Sendo estes os mais comumente isolados em tilápias no Brasil, o sorotipo Ib é o mais prevalente (CHIDEROLI et al., 2017).

A *S. agalactiae* foi relatado pela primeira vez em piscicultura de água doce no ano de 1966 por Jordan, Robinson e Meyer, nos Estados Unidos da América e desde então já foi isolado em truta arco-íris, tilápia, catfish e savelha (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; ROBINSON; MEYER, 1966). A *S. agalactiae* (Grupo B), além de patógeno importante para a aquicultura, é responsável por pneumonia, septicemia e meningite em seres humanos recém-nascidos, bem como alta taxa de morbidade em gestantes e mortalidade em adultos com sistema imunológico comprometido. É também de grande importância na medicina veterinária como agente causador de mastite clínica e subclínica em bovinos (LEIRA et al., 2016b; CHIDEROLI et al., 2017).

Portanto, para o controle dessas doenças de cunho bacteriano é importante a aplicação de medidas que previnam os surtos infecciosos tornado os animais mais imunocompetentes, ou medidas capazes de eliminarem estas enfermidades.

1.3 ADITIVOS ALIMENTARES

Durante as décadas de 1970 e 1980, os antibióticos começaram a ser usados em larga escala na produção aquícola para o controle de doenças bacterianas e como promotores de crescimento. Contudo, o uso indiscriminado e por longos períodos pode ocasionar a seleção de genes de resistência bacteriana aos antibióticos. Ademais, o uso de antibióticos desempenha efeitos prejudiciais ao ecossistema e aos seres humanos, onde a exposição prolongada a estas substâncias promove efeitos crônicos aos organismos (RINGO, 2019; SHEN et al., 2019; HAN et al., 2020).

Diante dessa problemática, em 2006 a União Europeia proibiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento e de forma preventiva na produção pecuária, sendo essa uma tendência mundial (LÜCKSTÄDT, 2008). Por isso, outras alternativas vêm sendo estudadas para promoverem melhorias no ambiente aquático, desempenho zootécnico e na saúde dos animais. Dentre estas substâncias emergentes, destaca-se o uso de os ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos, substâncias fitogênicas e enzimas, por exemplo (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018). Estas substâncias são classificadas como aditivos alimentares.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2004), aditivos alimentares destinados à alimentação animal podem ser substância, microrganismo ou um produto formulado, que não é comumente utilizado como ingrediente, podendo ou não ter valor nutritivo. Os aditivos alimentares, na sua grande maioria, visam melhorar às características tanto dos produtos destinados à alimentação animal, quanto o desempenho dos animais sadios e atender às suas necessidades nutricionais.

Os ácidos orgânicos, por exemplo, são aditivos alimentares que agem de forma eficiente na higiene alimentar por sua atividade antimicrobiana, o que favorece maior controle de patógenos no trato digestório (FEFANA, 2014). Esses ácidos são compostos carboxílicos, considerados ácidos fracos, que podem ser produzidos de forma artificial ou mediante a fermentação por bactérias benéficas (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018). As substâncias mais utilizadas em produtos comerciais são o ácido cítrico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiônico e ácido fumárico (SILVA et al., 2017).

Os ácidos orgânicos atuam na redução do pH do alimento promovendo a sua conservação através do efeito bacteriostático, que diminui a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos (SILVA et al., 2017) (Tabela 1). Quando acrescentados na dieta, podem acidificá-las, que irá acarretar possivelmente em: melhor digestibilidade e absorção dos

nutrientes; na saúde intestinal e imunológica; no desempenho produtivo; sobrevivência frente às enfermidades; e por isso estão sendo amplamente utilizados na nutrição animal (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018).

No trato gastrointestinal, esses ácidos podem reduzir o pH estomacal e promover, por conseguinte melhor atividade das enzimas digestivas, além do possível controle no balanço microbiológico do intestino através do efeito bacteriostático e/ou bactericida (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018) (Quadro 1).

Quadro 1: Efeitos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal.*

Local de ação	Forma efetiva	Efeitos
Dieta	H ⁺	Redução do pH Desnaturação de proteínas Redução no crescimento microbiano
	H ⁺ e ânion	Efeito antimicrobiano Mudança na microbiota do trato
Trato intestinal	H ⁺	Redução do pH do estômago e duodeno Aumento da atividade da pepsina
	Ânion	Disponibilização de cátions (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ e Zn ²⁺)
Metabolismo	H ⁺ e ânion	Fonte de energia

Fonte: Silva et al. (2017).

*H⁺ – Forma não ionizada. Ânion – Forma ionizada.

Há inúmeros produtos comerciais destinados a alimentação animal à base de ácidos orgânicos e seus sais, como aditivos alimentares nutritivos ou não, utilizados para melhorar a ingestão, digestão e absorção dos nutrientes presentes na dieta. Além de serem usados como promotores de crescimento, provedores de melhorias no sistema imunológico e fornecedores energéticos (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018; SILVA et al., 2017). As mistura de ácidos orgânicos também são utilizados para o controle de bactérias patogênicas presentes nas rações, como *Salmonella* e *Escherichia coli* (NG et al., 2009).

Contudo, a grande maioria destes produtos são destinados aos animais terrestres, como para a avicultura e suinocultura por exemplo, onde já existem numerosos estudos sobre seus efeitos e concentrações ideais de suplementação na dieta. Já para os animais aquáticos, há estudos para a piscicultura, truta arco-íris, tilápia, entre outras espécies aquáticas, porém em menor quantidade (SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2017; KIM et al., 2018).

Dentre os ácidos orgânicos com potencial de aplicabilidade na piscicultura, o ácido benzoico (C₇H₆O₂) vem ganhando destaque. Ele é um ácido carboxílico aromático simples, de forma sólida, incolor e cristalino. É encontrado em diversos alimentos, sendo por exemplo um

dos constituintes do extrato de amoras selvagens ou naturalmente na sua forma pura e da própolis de mel. Nos produtos fermentados, surge como um subproduto da degradação microbiana do ácido hipúrico e fenilalanina (OLIVEIRA; REIS, 2017).

1.3.1 Sais e ácidos orgânicos na piscicultura

a) *Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos*

Os ácidos orgânicos agem no trato gastrointestinal promovendo a redução do pH pela liberação de íons de hidrogênio (LÜCKSTÄDT, 2008). A força de um ácido orgânico é inversamente proporcional ao valor de sua constante logarítmica de dissociação (pKa), logo, quanto menor o pKa, mais forte é o ácido em questão. O valor de pKa é igual ao de pH em que 50% do ácido encontra-se dissociado e é único para cada molécula. Considerando que a maioria dos ácidos orgânicos são fracos, com dissociação parcial de seus íons, eles permanecem em sua forma não-dissociada em meios com valores de pH menores que o seu pKa. Nesta situação, há aumento da proporção de ácidos livres capazes de adentrar as células bacterianas por difusão simples (NG; KOH, 2016).

Outras características físico-químicas, como peso molecular e solubilidade, também são importantes para entender a eficácia de ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos. Ácidos com baixo peso molecular, como os ácidos fórmico, acético e láctico, são miscíveis em água enquanto os de alto peso molecular, como o ácido benzoico, são mais hidrofóbicos e, conseqüentemente, insolúveis em água (NG; KOH, 2016).

A ação dos acidificantes é dada pela capacidade de diminuição do pH citoplasmático quando atravessam as membranas celulares dos microrganismos que possuem pH específicos para seu crescimento ideal e não são capazes de sobreviver em condições ácidas extremas, como pH abaixo de 4,5. Os ácidos, então, liberam íons de hidrogênio no meio e impedem o crescimento e a proliferação das bactérias (NG; KOH, 2016).

O efeito bactericida e bacteriostático dos ácidos orgânicos é devido sua capacidade de penetrar na membrana das bactérias, se dissociando no citoplasma de pH neutro (NG; KOH, 2016). Como consequência, ocorre a dissociação dos ácidos, produção de ânions no interior das células bacterianas e a inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas. Diante disso, constata-se o aumento de bactérias Gram-positivas, as quais podem ser produtoras de ácido láctico que reduz o pH e, desta forma, ajuda a manter e aumentar o efeito da inibição das bactérias patogênicas no intestino através da exclusão competitiva (LÜCKSTÄDT, 2008; VAN IMMERSEEL et al., 2002).

A acidez também estimula o aumento das atividades das enzimas digestivas, como a pepsina, principal enzima responsável pela digestão estomacal de proteína nos peixes (BURNELL; CROMWELL; STAHLY, 1988). Além disso, o pH reduzido promove ação tamponante da dieta, que resiste a alterações de pH quando ácido ou base são acrescentados à ela, consequentemente acarreta melhor aproveitamento dos nutrientes pelo animal (DIAO et al., 2016). A acidificação também permite o aumento da secreção enzimática pelo pâncreas, o que ocasiona melhor digestibilidade proteica (BURNELL; CROMWELL; STAHLY, 1988; OLIVEIRA; ASSIS; BEZERRA, 2014).

b) Principais ácidos e/ou sais orgânicos

Na produção animal, tem-se utilizado uma infinidade de ácidos orgânicos e seus sais, com diferentes doses, minerais quelantes e efeitos sob a espécie suplementada. Os ácidos orgânicos podem ser classificados com base no número de grupamentos funcionais e quantidade de carbonos de sua cadeia (PARTANEN; MROZ, 1999). Segundo Ng e Koh (2018), atualmente há um grande interesse no uso dos ácidos orgânicos na aquicultura como aditivos funcionais aplicados nas rações devido a: intensificação irracional do sistema; busca de melhorias no desempenho de crescimento e no controle de patógenos; com melhor custo-benefício para os produtores em alternativa aos antibióticos.

À saber, o ácido fórmico (CH_2O_2) é um ácido monocarboxílico, ou seja, apresenta apenas um grupamento funcional carboxílico, e é a estrutura ácida mais simples encontrada. Esta substância pode ser evidenciada em plantas e insetos, e atua como agente de defesa e se apresenta como líquido incolor, potencialmente tóxico (BÜHLER, 2009). É utilizado como conservante em silagens de forrageiras pela eficiência no controle de bactérias e leveduras. Para a alimentação animal, é usado principalmente como formiato de potássio ou sódio, que está na forma de sal. Nessa forma é menos corrosivo e menos tóxico do que em sua forma livre (BÜHLER, 2009).

O ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) é outro monocarboxílico também de cadeia simples, contudo com dois carbonos em sua estrutura, apresenta-se na forma líquida incolor, é produzido por bactérias *Acetobacter* através da oxidação dos álcoois, inibe o crescimento de algumas espécies de bactérias e em menor grau, de leveduras e bolores (PARTANEN; MROZ, 1999).

O ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), também monocarboxílico e de cadeia simples, é um dos mais antigos métodos usados de conservação, produzidos por algumas bactérias, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* (PARTANER; MROZ, 1999), importante no desmame de leitões pela acidificação estomacal (DE FREITAS et al., 2006).

O ácido propiônico ($C_3H_6O_2$) e butírico ($C_4H_8O_2$), monocarboxílicos e de cadeia simples, são ácidos líquidos oleosos. O propiônico é derivado do propano, pela degradação de alguns ácidos graxos e aminoácidos e, agem principalmente contra fungos. Em um estudo realizado por Pereira et al. (2020) mostram que, além dessas propriedades, a suplementação dietética do sal de ácido propiônico alterou positivamente a microbiota intestinal de *Rhamdia quelen* promovendo aumento das comunidades bacterianas benéfica. O butírico é obtido pela fermentação de carboidratos nos ruminantes e no cólon de onívoros e já observado que essa fermentação no cólon possui efeito antineoplásico pela interrupção do ciclo celular com a diferenciação celular do adenoma colônico (KIEN; CHANG; COOPER, 1999).

O ácido benzoico, por sua vez, é um ácido monocarboxílico de cadeia de carbono aromática ($C_7H_6O_2$), é encontrada na forma sólida cristalina, pouco tóxica (OLIVEIRA; REIS, 2017) e está presente em frutas frescas, como morango ou em especiarias, como no cravo. Apresenta pKa de 4,2 e devido sua parte fenólica (cadeia aromática), exibe alto poder antibacteriano e antifúngico (OLIVEIRA; REIS, 2017). Torrallardona et al. (2007) demonstraram que a inclusão de 0,5% do ácido na dieta para leitões desmamados influenciou na microbiota ileal e cecal, melhorando o desempenho. Já Murphy et al. (2011) mostraram também para suínos que a inclusão de até 3% do ácido na dieta para indivíduos adultos reduz a excreção de nitrogênio e a liberação de amônia.

Já o ácido fumárico ($C_4H_4O_4$) é um ácido dicarboxílico, ou seja, apresenta dois grupamentos funcionais carboxílicos (LEHNEN et al., 2011), é encontrado em plantas e fungos (BÜHLER, 2009). É capaz de promover resistência à alcalinização do meio, por isso é utilizado na redução do pH das dietas. Sua ação antimicrobiana é devido a alta capacidade de dissociação e, quando não se apresenta na forma dissociada, atravessa a membrana celular bacteriana, onde se dissocia no citoplasma alcalino, liberando prótons e reduzindo o pH intracelular (LEHNEN et al., 2011; PARTANEN; MROZ, 1999).

O ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), por conseguinte, é um tricarboxílico, ou seja, apresenta três grupamentos funcionais carboxílicos, considerado ácido fraco, encontrado principalmente em frutas cítricas. Em temperatura ambiente se apresenta na forma cristalina e inodoro (FIB). Na produção animal é bastante utilizado como acidulante, conservante, estimulante e antioxidante, sendo eficaz na acidificação das rações e do trato gastrointestinal, além de agirem como agente antimicrobiano (MAIORKA et al. 2004). Na aquicultura, tem apresentado bons resultados para o desempenho e digestibilidade quando acrescentado na dieta de truta arco-íris (HOSSAIN; PANDEY; SATOH, 2007).

Diante do exposto, fica evidente que cada ácido orgânico apresenta suas vantagens de aplicabilidade nos diferentes setores alimentícios e do agronegócio. Ademais sua eficiência está intimamente relacionada a dose, ao animal a ser suplementado, ao tempo de uso, a quantidade de grupamentos funcionais carboxílico na substância, o tamanho e formato da cadeia de carbonos (simples ou aromática). Nesse sentido, há poucas pesquisas avaliando o ácido orgânico, monocarboxílico aromático, benzoico no âmbito da piscicultura.

1.3.2 Influência da suplementação de ácidos orgânicos

a) Performance zootécnica e saúde

Os ácidos orgânicos quando incrementados na dieta promovem maior consumo do alimento por proporcionar aumento de palatabilidade, com consequente ganho de peso (SILVA et al., 2008). Tal fato pode ser observado no estudo de Silva et al. (2008), onde utilizaram um blend de ácidos orgânicos, contendo bioflavonóides, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido lático e ácido fumárico, para alevinos de tilápias-do-nilo e obtiveram maior ganho de peso com a inclusão de 0,04%. Assim como Pereira et al. (2018) também observaram melhores índices no ganho de peso, na taxa de crescimento específico, conversão alimentar e na biomassa final em *Rhamdia quelen* alimentados com dieta suplementadas com propionato de cálcio a 0,25%.

Tal como para outras espécies animais, como apontado por Galassi et al. (2001), onde observaram que a inclusão de ácido benzoico nas concentrações 0,5% e 1% em dieta para suínos na fase de engorda não promoveram alterações no balanço de nitrogênio, fósforo e energia, mas favoreceu melhor desempenho no crescimento. Similarmente, Guggenbuhl et al. (2007) observaram que a inclusão de 0,5% do ácido na alimentação de suínos de 28 dias de idade promoveu melhores resultados no desempenho zootécnicos.

b) Digestibilidade de nutrientes

A digestibilidade dos nutrientes é uma característica do próprio alimento, do qual o animal pode se beneficiar em maior ou menor escala (PEREIRA et al., 2008). Segundo Tavares-Dias e Mariano (2015), a origem proteica do alimento fornecido nas pisciculturas pode provocar inibição na absorção dos minerais, como o fósforo, nitrogênio, potássio, magnésio, cálcio, zinco, ferro e o cobre, devido aos antinutrientes como fitato e fosfato tricálcico presentes nos ingredientes de origem vegetal.

Uma forma de melhorar a disponibilidade destes minerais em dietas cada vez mais ricas em fontes vegetais é o uso de ácidos orgânicos e seus sais. Essas substâncias melhoram a digestibilidade dos minerais em decorrência da diminuição do pH, o que ocasiona maior

dissociação desses compostos, melhor ativação da pepsina e de outras atividades enzimáticas. Como resultado, os ácidos orgânicos agem como agentes quelantes, ligando-se a cátions no intestino, que favorecem absorção facilitada dos nutrientes e melhor solubilidade dos minerais, que contribui para fontes de água mais limpas (KOH et al., 2016).

Um exemplo da influência dos ácidos orgânicos na digestibilidade dos nutrientes pode ser observado no estudo de Pandey e Satoh (2008), que obtiveram respostas positivas com a suplementação dos ácidos orgânicos cítrico e láctico no crescimento em Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Essa suplementação promoveu melhor disponibilização e digestibilidade de minerais, o que reduziu a excreção de fósforo e nitrogênio. A redução destes elementos diminuiu a carga orgânica dos efluentes e conseqüentemente menor impacto aos corpos receptores. Em outro estudo, foi usado lactato a 1% em truta-do-ártico (*Salvelinus alpinus*), Ringo, Olsen e Castell (1994) observaram que a suplementação não alterou o teor lipídico do filé, mantendo assim sua qualidade. Esta suplementação proporcionou também aos animais melhor crescimento, eficiência alimentar e mostrou diminuição de diarreias durante o cultivo.

Ademais, Koh et al. (2016) obtiveram melhora na digestibilidade de fósforo, matéria seca e cinzas em tilápias vermelhas (*Oreochromis sp.*) suplementadas com blend de 1% de ácidos orgânicos. Este estudo mostrou que os ácidos orgânicos ajudam na melhora da digestibilidade dos nutrientes e, como conseqüência, redução da competição e produção de metabólitos microbianos. Assim como a suplementação de ácido cítrico em dietas para juvenis de Beluga (*Huso huso*) demonstraram que a adição nas concentrações de 2 e 3% promoveram melhor retenção de cálcio e fósforo no músculo, além de aumentar a sua disponibilidade e a mineralização muscular (KHAJEPOUR; HOSSEINI, 2012).

c) Sistema imunológico

O sistema imune dos vertebrados é composto por um conjunto de células e órgãos que proporcionam proteção ao organismo. Alterações neste sistema podem aumentar ou diminuir a capacidade de resposta frente aos desafios ambientais e infecciosos. A diminuição da resposta imune favorece quadros de estresse agudo ou crônico, com conseqüente depressão do sistema imune. Por outro lado, o uso de aditivos alimentares em dietas, como vitaminas e imunostimulantes, por exemplo, contribuem para melhora no sistema imunológico do animal, aumento da eficiência no combate a patógenos e auxilia no aumento da produção (FIGUEIREDO, 2008; MACHADO et al., 2004).

O sistema imunológico dos vertebrados é dividido em inespecífico ou inato e em específico ou adaptativo, e diversos estudos já mostraram que tais sistemas atuam de forma simultânea e conjunta no combate e controle da propagação de patógenos (MAGNADÓTTIR, 2006).

O sistema imune inato geralmente antecede as respostas do sistema adaptativo. Ele é composto por: barreiras físicas como as escamas, epitélio, o muco da superfície corporal e das brânquias; barreiras celulares como as células fagocíticas, citotóxicas não específicas e as dendríticas; as barreiras humorais, presentes no plasma e nos líquidos corporais. O sistema inato primeiramente reconhece moléculas estranhas presentes no organismo, detectando componentes químicos e por estruturas presentes nas superfícies ou no interior dos patógenos (padrões moleculares associados a patógenos-PMAPs). Mesmo não havendo contato prévio com o agente agressor, há o reconhecimento dos PMAPs e posterior sinalização que uma infecção está ocorrendo (FIGUEIREDO, 2008).

Posteriormente, o sistema imune adaptativo age contra cada microrganismo específico e apresenta dois tipos de respostas, as humorais e as celulares, que variam com o agente patogênico da doença. As respostas humorais são mediadas por anticorpos e as respostas celulares, por células citotóxicas que estimulam a morte da célula infectada (FIGUEIREDO, 2008).

Um exemplo de como os ácidos orgânicos podem ser benéficos em relação ao sistema imunológico do animal suplementado é apresentado no estudo de Flores et al. (2012), onde aves infectadas com *Salmonella enteritidis* e tratadas com um blend de ácidos orgânicos apresentaram maior proporção de células T auxiliares (linfócitos) molécula co-estimulatória de linfócitos T ($CD28^+$), receptor de células T ($TCRV\beta 1^+$) e complexo principal de histocompatibilidade ($MHC II^{bright+}$), além de menor proporção de cluster de diferenciação 8 ($CD8\beta^+$), que é uma glicoproteína transmembrana que serve como um co-receptor para o receptor de células T (TCR). Tal fato demonstra uma resposta efetiva de proteção.

d) *Comunidade microbiana*

A comunidade microbiana intestinal dos peixes e de todos os outros vertebrados começa a ser formada antes do nascimento e continua a se transformar ao longo da vida do indivíduo. Estas alterações decorrem da interação com o meio externo (aquático ou terrestre) e dos alimentos a eles ofertados (ROMERO; RINGO; MERRIFIELD, 2014).

As superfícies epiteliais são colonizadas por microrganismos de relações comensais ou mútuas com seus hospedeiros, onde a maioria se encontra no trato digestivo e são bactérias

aeróbicas e anaeróbicas facultativas (ROMERO; RINGO; MERRIFIELD, 2014). É conhecido que a microbiota intestinal desempenha importante função tanto na digestão quanto na síntese de nutrientes, metabolismo energético e nas respostas imunes do hospedeiro (BIK, 2009). Sendo responsável, portanto, pelo desenvolvimento da mucosa, angiogênese e da barreira de proteção contra patógenos (ROMERO; RINGO; MARRIFIELD, 2014).

Há estudos que mostram que o intestino dos peixes também contém bactérias anaeróbicas obrigatórias. Essa colonização depende do pH intestinal, peristaltismo, dos ácidos biliares, das enzimas digestivas, por exemplo. Como consequência, a composição da microbiota pode ser alterada quando há alteração em um desses componentes, devido a competição das bactérias por nutrientes. A adesão das bactérias na mucosa intestinal se dá pela interação das lectinas com as glicoproteínas derivadas das próprias bactérias, das células epiteliais ou dos substratos alimentares (EVARISTE et al., 2019; MARRIFIELD; RINGO, 2014; IZVEKOVA; IZVEKOV; PLOTNIKOV, 2007).

No estudo de Koh et al. (2016), tilápias vermelhas (*Oreochromis sp.*) suplementadas com 0,5% e 1% de blend de ácidos orgânicos apresentaram redução na população bacteriana e maior resistência a *S. agalactiae* quando comparadas ao grupo controle. Outro exemplo de como os ácidos orgânicos atuam no controle microbiológico é dado no estudo de Pereira et al. (2020) onde a suplementação do sal do ácido propiônico na concentração de 1% propiciou aumento de unidade taxonômicas operacionais (OTUs-diversidade microbiana) em *Rhamdia quelen*.

Assim como, o estudo de Ng et al. (2009) com alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) desafiados com *S. agalactiae*, alimentados com um blend de ácidos orgânicos reforça uma maior resistência nos grupos suplementados em comparação ao grupo controle. Ademais, este estudo também apresentou redução significativa de *Aeromonas hydrophila* por grama de fezes, principalmente nos grupos que receberam o blend na dose de 0,1%.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento da piscicultura através da validação da suplementação dietética do ácido orgânico benzoico no auxílio da saúde e nutrição de tilápia-do-nilo.

1.4.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a influência da suplementação dietética das diferentes concentrações do ácido benzoico sob os parâmetros zootécnicos, hematológicos e imunológicos da tilápia-do-nylo;

b) Avaliar a influência da suplementação dietética das diferentes concentrações do ácido benzoico para tilápia-do-nylo sobre a sobrevivência e parâmetros imunológicos após desafio bacteriano com *S. agalactiae* soro tipo B.

1.5 ESTRUTURA DO TRABALHO

O capítulo 1, introdução geral, desta dissertação está formatado de acordo com as normas da ABNT. O capítulo 2 é composto de um artigo, submetido ao periódico “Aquaculture” e formatado segundo suas normas.

2 CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

Dietary supplementation with benzoic organic acid improves the growth performance and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after challenge with *Streptococcus agalactiae* (Group B)

Libanori, M.C.M.¹; Santos, G.G.¹; Pereira, S.A.¹; Lopes, G.R.¹; Owatari, M.S.¹; Soligo, T.A.²; Yamashita, E.³; Pereira, U.P.⁴; Martins, M.L.¹; Mouriño, J.L.P.¹

¹ AQUOS- Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, UFSC, Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88037-000, Florianópolis, SC, Brazil

² DSM- Nutritional Products Costa Rica, Industrial Park Z, Santo Domingo de Heredia, 40301, Heredia, Costa Rica

³ DSM- Produtos Nutricionais Brasil S.A, Avenida Juscelino Kubitschek, 1909, 5º floor, São Paulo, Brazil

⁴ LABBEP- Department of Preventive Veterinary Medicine, Laboratory of Bacteriology in Fish, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid PR-445, km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

Corresponding author: Maria Clara Miguel Libanori (AQUOS-Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, UFSC, SC, Brazil). E-mail address: mclara.libanori@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of dietary supplementation with benzoic organic acid in different concentrations on juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Was evaluated the growth performance, hemato-immunological parameters and survival after challenge via gavage with *Streptococcus agalactiae*. A total of 320 juvenile fish were divided into 16 tanks were divided into four groups according to the concentrations of inclusion of benzoic acid in diets previously formulated to meet the nutritional requirements of the species. Namely control group without inclusion (Control_{0%}); fish fed diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA_{0.1%}); fish fed diet supplemented with 0.2% (BA_{0.2%}) benzoic acid and fish fed diet supplemented with 0.3% (BA_{0.3%}) benzoic acid for 54 days. Four replicates were included per treatment. The fish fed with BA_{0.1%} showed better results in weight gain (51.01 ± 3.40), final biomass (1040.88 ± 79.40), specific growth rate (4.18 ± 0.05), food conversion (1.38 ± 0.03), end mean weight (56.96 ± 3.60) and in biomass gain (922.15 ± 58.21) when compared to the control group. The fish fed with BA_{0.1%} still showed higher percentage of survival (59%) after exposure to the pathogen. Fish fed BA_{0.1%} presented high hemoglobin values (9.31 ± 1.14), leukocytes (3.45 ± 0.48) and lymphocytes (285.00 ± 40.90) in relation to other treatments, before exposure. Total protein and total immunoglobulin, increased in pre-exposed fish supplemented with 0.1% benzoic acid. These results suggest that the addition of benzoic acid supplemented at 0.1% in the Nile tilapia diet improved the growth performance, hemato-immunological parameters and survival.

Key words: Disease resistance, survival, food additive, immune system.

2.1 INTRODUCTION

Aquaculture is currently one of the world's expanding food sectors. Its rapid growth is mainly due to the increasing consumption of aquatic foods and the consequent intensification of farming systems (Ng and Koh, 2016). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is among the most cultivated fish worldwide, it has good consumer acceptance owing to its meat characteristics. Tilapia also adapts well to cultivation systems due to its rusticity, resistance to wide environmental variation and ease of reproduction and manipulation (Amal and Zamri-Saad, 2011).

Concurrent with the intensification of aquaculture systems, there is also an increase in the occurrence of fish diseases (Culot et al. 2019). Among the main bacterial infections that affect tilapia, we highlight *Streptococcus* sp., *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *trichodinids* and *Gyrodactylus niloticus* (Amal and Zamri-Saad, 2011).

It is also noted that among bacterial diseases, outbreaks of streptococcosis have become common in aquaculture production and contribute to high mortality rates in aquaculture systems (Amal and Zamri-Saad, 2011). Within this large group, the species *Streptococcus agalactiae* is an etiological agent that has a wide range of hosts, having already been isolated in terrestrial homeothermic animals and aquatic ectothermic animals from several geographic regions (Figueiredo et al. 2006). It is currently considered an emerging disease in the tilapia industry, due in part to the high associated mortality rate. Consequently, great economic losses are associated with this disease (Amal and Zamri-Saad, 2011; Figueiredo et al. 2006).

In order to mitigate possible disease outbreaks on fish farms, many facilities abuse the use of antibiotics for disease control and prevention (Han et al. 2020). These substances can also act as growth promoters by improving feed conversion and animal survival (Khajepour and Hosseini, 2012). However, the indiscriminate use of antibiotics leads to the development of resistant strains of bacteria, resulting in damage to ecosystems and human health (Mo et al. 2019). For this reason, alternatives to antibiotics have been sought, which could act in the line of prevention and increase the immune response (Loddi et al. 2000). In order to increase fish health and minimize the input costs of fish production, organic acids have been studied (Ng and Koh, 2016). They improve the health, economics and safety of aquaculture production, both for the consumer and the environment (Lückstädt, 2008). Organic acids have preservative properties, efficiently control pathogens in the digestive tract due to their antimicrobial properties and provide favourable means for the multiplication of lactic bacteria (beneficial to the host), which can favour nutrient absorption from food (Silva et al. 2017).

Currently, there are several organic-acid-based alternative products for use in animal production, most of which are intended for land animals (Alemayehu et al. 2018; Silva et al. 2017; Silva et al. 2008). On this view, there is still little knowledge about the effects of these organic acids on aquatic animal nutrition in the literature animals (Alemayehu et al. 2018; Silva et al. 2017; Silva et al. 2008). However, research has already shown an improvement in the production rates of some species of fish and shrimp when organic acids are increased in the diet (Khajepour and Hosseini, 2012).

Organic acids are considered weak acids due to their ease of partial dissociation in water, thus forming a hydrogen ion (H^+) and a carboxylate ion (COO^-) (Alemayehu et al. 2018). They act as preservatives in foods in storage by preventing their deterioration (Ng and Koh, 2016) and have the ability to change from their non-dissociated to their dissociated forms, depending on the environmental pH (Partanen and Mroz, 1999). When in their non-dissociated forms, they passively penetrate the pathogenic organism, where protons and anions are released; the result is a reduction in intracellular pH (Viola and Vieira, 2007). The release of H^+ ions from dissociated organic acids causes a decrease in pH in the beginning segment of digestive tract of supplemented animal's, acting under pepsin and consequently, in digestion. In addition, these free radicals have bactericidal and bacteriostatic action in the digestive tract. Because of these capabilities, they have been used in animal feed as an additive to improve intestinal health and performance (Alemayehu et al. 2018).

Among the organic acids, benzoic acid is one of the most important simple aromatic carboxylic acids and can be found in its pure form in nature in some fruits, such as apples and grapes, and even in fermented products, such as yogurt and beer, among others. It was obtained for the first time in the early 17th century through the purification of benzoin gum (*Styrax benzoin*) (Oliveira and Reis, 2017; Gheler et al. 2009). It has a pKa of 4.2, and due to its phenolic moiety, it exhibits high antibacterial and antifungal activity (Oliveira and Reis, 2017). However, there are still few studies and little information on benzoic acid in fish farming (Kim et al. 2018).

This study hypothesized that the use of organic acids may influence fish resistance and zootechnical parameters. Therefore, we used different concentrations of benzoic organic acid in the diet of Nile tilapia evaluated on zootechnical, haemato-immunological parameters and survival after a challenge via gavage with *S. agalactiae*.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Fish, organic acid and bacterial strain

Nile tilapia of the GIFT lineage were from a monosex male population donated by Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), located in the city of Itajaí, Santa Catarina. Benzoic acid (VevoVital[®]) was manufactured by the company DSM[®], São Paulo, Brazil. *S. agalactiae* S13 serotype Ib was isolated from an outbreak of mortality on a tilapia farm located in the Paraná State by Facimoto et al. (2017) and granted to AQUOS Laboratory, UFSC. The complete genome sequence is available in public DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number CP018623 and BioProject number PRJNA356737. The fish handling procedures were approved by the Ethic Committee on the Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC 2793230320).

2.2.2 *In vitro* test and antagonism against *Streptococcus agalactiae*

For determination of the organic acid used in this study, the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed, where different organic acids were tested and diluted to 8% in PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Sigma-Aldrich[®]). Test solutions were as follows: benzoic acid (C₇H₆O₂) (VevoVital[®]-DSM); calcium propionate (C₆H₁₀CaO₄); sodium butyrate (C₄H₇NaO₂); sodium propionate (C₃H₅NaO₂) and sodium formate (HCO₂Na).

Subsequently, the pH of these solutions was adjusted to 6.5, and sterilization was performed by filtration through a Millipore 0.22 µm filter. For analysis, 100 µL of Luria Bertani (LB) medium was added (10 g L⁻¹ peptone, 5 g L⁻¹ yeast extract and 30 g L⁻¹ NaCl) to each well of a 96-well flat-bottom microplate, and 100 µL of each test solution was added only to the first well of the row. Serial 2-fold dilutions were performed until the 12th well. A culture of *S. agalactiae* maintained in LB medium was seeded at a concentration of 1 x 10⁹ (UFC mL⁻¹), according to a growth curve (absorbance × cell concentration) previously performed. Then, 20 µL of this suspension was added to all wells. For controls, only LB was used, without adding test solutions, whether or not the bacteria were added (positive and negative control, respectively), and to control the technique, the antibiotic Azithromycin[®] was used (200 mg mL⁻¹). The microplates were incubated at 32°C for 24 h and the growth of microorganisms determined in a microplate reader (ASYS Expert Plus, UK) DO595nm. The minimum inhibitory concentration was the reciprocal of the last dilution of organic acid or antibiotic where there was total inhibition. All tests were performed in triplicate.

2.2.3 Experimental diets

The experimental base diet was formulated to meet the nutritional requirements of the species according to the NRC (2011) (Table 1). The diet was produced by extrusion in pellets of 2 mm. A horizontal mixer (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brazil) was used to mix the dry ingredients and the extrusion carried out in a simple screw extruder MX40 (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brazil). The extrusion conditions were tested and adjusted in advance, and the extrusion parameters were as follows: the temperature in the cannon head was 85°C, and a humidity level of 24% was attained with deionized water. After extrusion, the feed was oven dried at 50°C for 4 h, followed by packaging and storage at –20°C until use.

The proximate composition of the diet was determined at the Nutrition Laboratory of Federal University of Santa Catarina (LABNUTRI / UFSC), following standard procedures detailed by the AOAC (1997), including humidity levels (the samples were dried at 105°C until constant weight, method 950.01), crude protein (Kjeldahl, método 945.01), ether extract (Soxhlet, method 920.39C) and mineral matter (by muffle incineration, method 942.05) (Table 1).

Table 1: Formulation and analysis of the proximate composition (dry matter) of the base diet used in the experiment.

Ingredient (%)	Control_{0%}	BA_{0.1%}	BA_{0.2%}	BA_{0.3%}
Soybean meal	50	50	50	50
Chicken viscera	10	10	10	10
Rice meal	21.85	21.85	21.85	21.85
Corn	17.1	17.1	17.1	17.1
Soy oil	0.7	0.7	0.7	0.7
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Premix ¹	0.15	0.15	0.15	0.15
Benzoic acid ²	0	0.1	0.2	0.3
Moisture (g kg ⁻¹)	871.6	871.6	871.6	871.6
Crude protein	350.8	350.8	350.8	350.8
Ethereal extract	55.9	55.9	55.9	55.9
Mineral matter	54.3	54.3	54.3	54.3

¹Premix DSM Rovimix composition: Vitamin A 5.333.000 IU kg⁻¹; Vitamin D3 1.000.000 IU kg⁻¹; Vitamin E 66.7 g kg⁻¹; Vitamin K3 3.33 g kg⁻¹; Vitamin B1 6.67 g kg⁻¹; Vitamina B2 10 g kg⁻¹; Vitamina B6 10 g kg⁻¹; Vitamina B12 0.013 g kg⁻¹; Niacin 53.33 g kg⁻¹; Pantothenic acid 26.67 g kg⁻¹; Biotin 0.333 g kg⁻¹; Folic acid 2.67 g kg⁻¹; Vitamin C 100 g kg⁻¹; Copper 3.33 g kg⁻¹; Iron 20 g kg⁻¹; Manganese 16.67 g kg⁻¹; Iodine 0.67 g kg⁻¹; Cobalt 0.033 g kg⁻¹; Zinc 26.6 g kg⁻¹; Selenium 0.167 g kg⁻¹. ² Product provided by DSM Nutritional Products.

For the preparation of the diet supplemented with benzoic acid, first a stock solution was prepared (benzoic acid 8%, diluted in 50% of cereal alcohol and 50% in sterile saline; SSE

0.65%). From that solution, dilutions were made in SSE so that the final concentrations were 0.1%, 0.2% and 0.3%. Subsequently, the amount of feed to be provided each week (7 days) to the experimental group was weighed, and the respective concentrations of benzoic acid was sprayed in the proportion of 100 mL kg⁻¹ of feed. In the diet of the unsupplemented group (control, 0%), only SSE was sprinkled in the same proportions and conditions. Following application (0; 0.1; 0.2 and 0.3%), the diets were hermetically sealed and kept under this condition for 30 minutes so that the substance was able to penetrate the pellet. Then, the containers were opened and the rations dried in a bacteriological oven with air recirculation at 30°C for 24 h. This procedure was performed weekly.

2.2.4 Experimental design

A total of 320 juvenile fish with an initial mean weight of 5.76 ± 0.24 g were divided into 16 polyethylene tanks with a capacity of 100 L and a usable volume of 70 L, with 20 fish per tank and four replicates in each experimental group. The fish were acclimated for 15 days under experimental units and received only the control diet during this period.

The experimental groups to determine the ideal concentration of dietary supplementation of benzoic acid were:

- a) Unsupplemented (control_{0%});
- b) Fish fed diet supplemented with benzoic acid 0.1% (BA_{0.1%});
- c) Fish fed diet supplemented with benzoic acid 0.2% (BA_{0.2%});
- d) Fish fed diet supplemented with benzoic acid 0.3% (BA_{0.3%}).

The fish were fed according to the feeding table proposed by the company EPAGRI (Silva and Marchiori, 2018), which takes into account the temperature and size of the fish. To monitor growth, biweekly biometrics were performed. When an excess of food was noted, the next day a 10% reduction was standardized; when no food was noted, 10% more was added the next day. Excess food and excreta were removed from the tanks two times a day by siphoning. The trial lasted 54 days.

During the experimental period, the experimental units (EU) were coupled to a semi-open water recirculation system with a flow rate of 0.022 L s⁻¹, composed of a decanter and mechanical and biological filters (anaerobic and aerobic), which included ultraviolet sterilization and a controlled photoperiod of 12 h (Owatari et al. 2018). Water quality was measured daily. Oxygen, alkalinity, pH, total ammonia, toxic ammonia, nitrite and nitrate were measured by the colorimetric method (Kit Labcon Test[®], Brasil). The water quality

parameters were kept within safe values (Boyd and Pillai, 1984) as follows: water temperature $28.90 \pm 2.36^{\circ}\text{C}$; dissolved oxygen $7.00 \pm 1.07 \text{ mg L}^{-1}$; alkalinity $49.08 \pm 28.48 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$; pH 6.70 ± 0.34 ; total ammonia $4.25 \pm 1.56 \text{ mg L}^{-1}$; toxic ammonia $0.02 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$; nitrite $1.93 \pm 0.72 \text{ mg L}^{-1}$ and nitrate $3.5 \pm 1.5 \text{ mg L}^{-1}$.

At the end of the feeding trial (54 days), the fish were sampled for measurement of zootechnical indices, and six fish per tank were used for haemato-immunological analyses. The remaining fish were kept in the tanks for experimental challenge via gavage with *S. agalactiae* (CP018623). The fish that survived the infection were sampled for plasma collection and subsequent immunological analyses.

2.2.5 Zootechnical indices

At the end of the feeding trial (54 days) and after 24 h of fasting, all fish from each experimental unit were anesthetized with eugenol Vetec® (75 mg/L^{-1}), counted and weighed on a precision scale (0.01 g). Weight gain (WG), Biomass (B), weight gain in biomass (WGB), specific growth rate (SGR), feed conversion (FC) and survival rate (SR) were analysed using the following equations (Lazzari et al. 2011):

- a) $\text{WG} = \text{final weight average} - \text{initial weight average}$
- b) $\text{B}_{(\text{initial or final})} = \text{weight average}_{(\text{initial or final})} * \text{number of fish}_{(\text{initial or final})}$
- c) $\text{WGB} = \text{final biomass} - \text{biomass initial}$
- d) $\text{FC} = \text{diet consumption} / \text{WG}$
- e) $\text{SR} = (\text{number of animals at the end} / \text{number of animals at the beginning}) * 100$

2.2.6 Hematological analysis

At the end of the experiment, six fish per tank were anesthetized with eugenol Vetec® (75 mg L^{-1}), and the blood was withdrawn from the caudal vein using syringes with the anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for haematological analysis. Subsequently, blood smears were made in duplicate and stained with May-Grunwald Giemsa Wright stain (Ranzani-Paiva et al. 2013) for differential leukocyte count and total thrombocyte count. Total leukocyte count (WBC) was obtained by the indirect method (Ranzani-Paiva et al. 2013) from blood smears. An aliquot of blood was used to determine the haematocrit (Goldenfarb et al. 1971), and another was used to quantify the total number of erythrocytes (RBC) in a Neubauer chamber after dilution 1:200 in Dacie solution modified according to Blaxhall and Daisley (1973). The analysis of haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin and

mean corpuscular haemoglobin concentration were realized using the equations by Ranzani-Paiva et al. (2013).

2.2.7 Immunological analysis

The remaining blood used in haematological analysis was allowed to coagulate for 1 h and centrifuged at 1400 g for 15 min at 4 °C to obtain blood plasma. The blood plasma was combined into pools of six fish per experimental unit and stored at –20°C for immunological analysis before and after infection.

Total plasma protein was measured using a commercial total protein kit (Lab Test®). Total immunoglobulin was measured according to the method of Amar et al. (Amar et al. 2000), where 100 µL of plasma were added to 100 µL of 12% polyethylene glycol solution (PEG) (Sigma-Aldrich) and incubated at room temperature (24°C) for 2 h for the precipitation of immunoglobulin molecules. The precipitate was removed by centrifugation (5000 g at 4 °C for 10 min). After removal of the supernatant, the total protein amount was measured with a commercial kit (Lab Test®), and bovine albumin was used to construct a standard curve. The immunoglobulin concentration was expressed in mg.mL⁻¹ according to the following formula:

$$\text{Total immunoglobulin} = (\text{total protein in the serum} - \text{total protein PEG treated})$$

Titration of agglutination activity was performed in 96-well U-bottom microplates by diluting the plasma in a 1:1 ratio in PBS in the first well (50 µL PBS solution:50 µL plasma) and performing serial 1:2 dilutions until the 12th well. Subsequently, 50 µL of inactivated *S. agalactiae* was added to all the wells. The microplate was incubated at 25°C for 18 h in a humidified chamber. Agglutination was confirmed by the observation of a precipitate in the bottom of the well and was considered as the reciprocal of the last dilution that presented agglutination (Silva et al. 2009).

The antimicrobial activity of plasma was determined against *S. agalactiae* in 96-well flat bottom microplates according to Silva et al. (2009). The *S. agalactiae* inoculum was cultured in brain heart infusion (BHI) broth for 24 h at 28°C, prepared at a concentration of 0.2 on the MacFarland scale and diluted in poor broth medium (PB) at 1 x 10⁹ UFC mL⁻¹. The plasma was diluted in a 1:3 ratio in poor broth medium (PB) in the first well (50 µL plasma: 150 µL PB), and serial 1:2 dilutions were performed until the 12th well. For positive and negative controls, saline solution was diluted in PB, as was done with the plasma. Finally, 10 µL of *S. agalactiae* was added to the wells containing diluted plasma and the positive control. The microplates were incubated at 24 h at 28°C. The microorganism growth read in microplate

reader, at a wavelength of 550 nm. The antimicrobial titre was the reciprocal of the last dilution that presented antibacterial activity with total inhibition of microbial growth.

2.2.8 *Streptococcus agalactiae* challenge

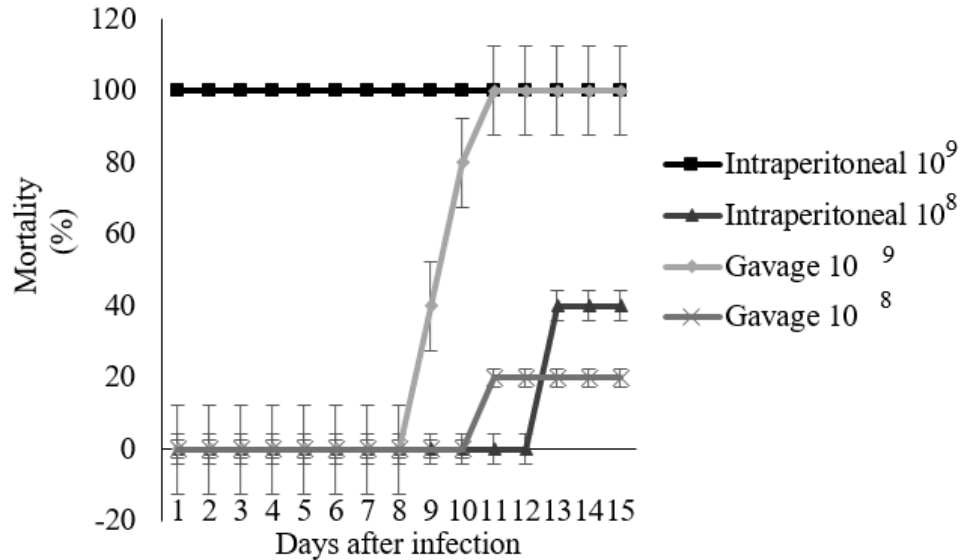
To determine the dose and route for experimental infection, 20 fish were distributed into four tanks, with 5 fish per tank, equipped with heaters to keep the water temperature at 30.00 ± 1.00 °C. In this way, ten fish were challenged with the concentration of 1×10^8 (UFC mL⁻¹), five received this dose via gavage and five intraperitoneal. The same procedure was carried out for fish challenged with 1×10^9 (UFC mL⁻¹).

The bacterium *S. agalactiae* was cultured in BHI broth at 30°C for 24 h and later spread on a Mueller Hinton agar plate containing 5% defibrinated sheep blood to increase the pathogenicity of the strain and incubated at 30°C for 24 h. In sequence, the inoculum was grown in BHI again and under the same conditions. After growth, the inoculum was centrifuged at 4,000 g for 30 min at 4 °C and resuspended in 10 mL of sterile saline solution (0.65 % NaCl) at doses of 1×10^8 and 1×10^9 colony forming units (UFC mL⁻¹), according to the McFarland scale, correlated with a previous curve of cell growth. All of the fish received 100 µL of the respective doses, orally (gavage) or intraperitoneally. Cumulative mortality was evaluated for 15 days. The concentration of 1×10^9 (UFC mL⁻¹) administered intraperitoneally killed all individuals in less than 3 h and was discarded for the experimental challenge. The dose chosen was the concentration 1×10^9 (UFC mL⁻¹) orally administered, because it promoted a less accentuated mortality curve and 10 days after infection 80% mortality was observed (Figure 1).

The remaining fish were infected with 1×10^9 (UFC mL⁻¹) orally, mortality was monitored daily for 15 days and the bacterium re-isolated to confirm the causative agent.

- a) Control group: 29 fish with a mean weight of 44.10 ± 1.62 g;
- b) Group supplemented with BA_{0.1%}: 32 fish with a mean weight of 56.96 ± 3.60 g;
- c) Group with BA_{0.2%}: 40 fish with a mean weight of 48.66 ± 2.63 g;
- d) Group supplemented with BA_{0.3%}: 43 fish with a mean weight of 49.63 ± 3.60 g.

Figure 1: Mortality curve of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged with (CP018623) in concentrations of 1×10^8 e 1×10^9 (UFC mL⁻¹) via gavage and intraperitoneal to calculate the lethal dose.



2.2.9 Statistical analysis

All data were submitted to Shapiro-Wilk and Levene tests to verify normality and homoscedasticity respectively. Data that are not homogeneous were transformed in $\log_{10}(x + 1)$. Next, the data were submitted to a variance analysis unifactorial and the means were separated by a Tukey test. Immunological data were submitted to bifactorial analysis of variance when significant differences were verified, the means were compared by the Tukey test. All of the tests were realized at a significance value of 5% with the aid of Statistica 10.0 software.

2.3 RESULTS

2.3.1 In vitro test antagonism against *S. agalactiae*

The test of minimum inhibitory concentration (MIC) demonstrated that the benzoic acid solution (VevoVital[®] DSM) was more effective at inhibiting the growth of the strain *S. agalactiae*, as lower concentrations of the active ingredient were needed, when compared with the antibiotic. *S. agalactiae* was also sensitive to the antibiotic Azithromycin, with a minimum inhibitory concentration of 3.125 (mg mL⁻¹) (Table 2).

Tabela 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of the test solutions against *Streptococcus agalactiae* in the concentration 1×10^9 colony-forming units (CFU mL⁻¹). Data presented as means \pm standard deviation for each substance. For the antibiotic Azithromycin.

Test substances	MIC (%)
Azithromycin (mg mL ⁻¹)	3.125 \pm 0.01 ^c
Benzoic acid (C ₇ H ₆ O ₂) (VevoVital [®] DSM)	0.048 \pm 0.03 ^a
Ca-propionate (C ₆ H ₁₀ CaO ₄)	0.214 \pm 0.01 ^{ab}
Na-butyrate (C ₄ H ₇ NaO ₂)	0.429 \pm 0.01 ^{ab}
Na-propionate (C ₃ H ₅ NaO ₂)	0.107 \pm 0.01 ^{ab}
Na-formate (HCO ₂ Na)	0.580 \pm 0.48 ^b

*Different letters indicate significant difference by tukey test ($p < 0.05$).

2.3.2 Zootechnical indices

Fish supplemented with BA_{0.1%} performed better in terms of final weight (p value: 0.013), final biomass (p value: 0.004), average weight gain (p value: 0.012), biomass gain (p value: 0.001), feed conversion (p value: 0.018) and specific growth rate (p value: 0.008), compared with the unsupplemented group (Table 3). In comparison, the group supplemented with BA_{0.1%} presented an increase of 29% in final weight, 38% in final biomass, more than 33% in average weight gain and 58% in biomass gain, compared with the control group.

Table 3: Zootechnical performance of Nile tilapia fed diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA_{0.1%}), 0.2% benzoic acid (BA_{0.2%}), 0.3% benzoic acid (BA_{0.3%}) or not supplemented (control0%) for 54 days. Data presented as means \pm standard deviation.*

Parameters	Control0%	BA _{0.1%}	BA _{0.2%}	BA _{0.3%}	p value
Initial mean weight (g)	5.99 \pm 0.09	5.94 \pm 0.20	5.84 \pm 0.10	5.77 \pm 0.07	0.160
Initial biomass (g)	119.90 \pm 2.57	118.73 \pm 3.71	116.73 \pm 1.78	113.53 \pm 2.74	0.160
Final weight (g)	44.10 \pm 1.62 ^b	56.96 \pm 3.60 ^a	48.66 \pm 2.63 ^{ab}	49.63 \pm 3.60 ^{ab}	0.013
Final biomass (g)	752.54 \pm 100.98 ^b	1040.88 \pm 79.40 ^a	988.18 \pm 65.84 ^a	992.56 \pm 71.93 ^a	0.004
Weight gain (g)	38.10 \pm 1.71 ^b	51.01 \pm 3.40 ^a	42.83 \pm 2.73 ^{ab}	43.95 \pm 3.52 ^{ab}	0.012
Biomass gain	632.64 \pm 90.17 ^b	922.15 \pm 58.21 ^a	871.44 \pm 66.24 ^a	879.03 \pm 70.40 ^a	0.001
Food conversion	1.59 \pm 0.01 ^b	1.38 \pm 0.03 ^a	1.44 \pm 0.03 ^{ab}	1.50 \pm 0.07 ^{ab}	0,018
Specific growth rate	3.69 \pm 0.09 ^b	4.18 \pm 0.05 ^a	3.92 \pm 0.13 ^{ab}	4.01 \pm 0.12 ^{ab}	0.008
Survival (%)	88.72 \pm 8.98	94.99 \pm 4.49	92.50 \pm 10.31	98.75 \pm 2.17	0.194

* Different letters indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

2.3.3 Hematological analysis

At the end of the feeding period, the fish showed little change in blood parameters due to the supplementation of different concentrations of benzoic acid. However, the fish fed with BA_{0.3%} (p value: 0.016) presented a haemoglobin concentration equal to the control and higher than fish supplemented with BA_{0.1%}. In addition, fish supplemented with BA_{0.1%} showed a

higher concentration of total leukocytes and lymphocytes (p value: 0.003 and 0.035, respectively) than those fed with the concentration of BA_{0.2%} (Table 4).

Table 4: Hematological parameters of Nile tilapia fed diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA_{0.1%}), 0.2% benzoic acid (BA_{0.2%}), 0.3% benzoic acid (BA_{0.3%}) or not supplemented (control_{0%}) for 54 days. Data presented as means \pm standard deviation.*

Parameters	Control _{0%}	BA _{0.1%}	BA _{0.2%}	BA _{0.3%}	p value
RBC (x 10 ⁶ μ L ⁻¹)	3.06 \pm 0.31	3.36 \pm 0.49	3.10 \pm 0.56	3.12 \pm 0.98	0.368
Thrombocytes (x 10 ⁴ μ L ⁻¹)	1.18 \pm 0.93	1.09 \pm 0.83	1.15 \pm 0.92	1.11 \pm 1.06	0.627
WBC (x 10 ⁴ μ L ⁻¹)	3.10 \pm 0.31 ^{ab}	4.78 \pm 0.48 ^a	5.65 \pm 0.56 ^b	5.15 \pm 0.51 ^b	0.003
Lymphocytes (x 10 ³ μ L ⁻¹)	256.00 \pm 35.50 ^{ab}	285.00 \pm 40.90 ^a	254.00 \pm 56.00 ^b	230.00 \pm 71.40 ^{ab}	0.035
Monocytes (x 10 ³ μ L ⁻¹)	17.20 \pm 8.82	14.30 \pm 9.36	18.80 \pm 10.30	17.00 \pm 11.00	0.199
Neutrophils (x 10 ³ μ L ⁻¹)	18.00 \pm 16.00	26.40 \pm 27.00	20.90 \pm 12.10	17.80 \pm 13.50	0.653
LG-PAS (x 10 ³ μ L ⁻¹)	3.65 \pm 3.10	4.58 \pm 4.46	3.98 \pm 4.28	2.81 \pm 2.62	0.845
Eosinophils (x 10 ³ μ L ⁻¹)	1.57 \pm 2.44	1.48 \pm 2.54	1.42 \pm 2.37	2.08 \pm 4.33	0.707
Basophil (x 10 ³ μ L ⁻¹)	08.60 \pm 5.01	12.70 \pm 11.00	11.00 \pm 8.58	12.70 \pm 7.60	0.341
Hematocrit (%)	29.58 \pm 4.81	29.00 \pm 4.75	29.46 \pm 5.65	29.13 \pm 3.80	0.650
Hemoglobin (g dL ⁻¹)	7.56 \pm 0.53 ^b	9.31 \pm 1.14 ^a	8.01 \pm 0.8 ^{ab}	8.71 \pm 0.90 ^{ab}	0.016
MCV (fL)	0.98 \pm 0.19	0.93 \pm 0.17	0.98 \pm 0.22	0.99 \pm 0.23	0.870
MCH (g dL ⁻¹)	0.29 \pm 0.067	0.29 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05	0.29 \pm 0.04	0.233
MCHC (g dL ⁻¹)	26.18 \pm 1.69	29.19 \pm 2.08	28.84 \pm 4.65	29.76 \pm 3.71	0.350

RBC: Red blood cells, WBC: White blood cells, LG-PAS: leukocyte PAS positive, MCV: Mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration.

*Different letters indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

2.3.4 Immunological analysis

With respect the parameters total protein and total plasma immunoglobulin, a decrease of these was observed after the experimental challenge via gavage with *S. agalactiae*, which shows that the infection promoted weakening of the fish' immune system regardless of the concentration of supplemented benzoic acid (Table 5). In addition, the total protein concentration was higher pre-infection, mainly in the group supplemented with BA_{0.1%}, while post-infection, the highest concentration was observed in fish supplemented with BA_{0.1%}, compared with the control group and BA_{0.3%} (Table 5).

In reference to the total immunoglobulin concentration, the group supplemented with BA_{0.1%} showed higher values before and after infection, compared with the other treatments. Moreover, following the experimental challenge with *S. agalactiae*, fish supplemented with benzoic acid in the concentrations BA_{0.1%} and BA_{0.3%} showed a significant reduction in immunoglobulins compared with pre-infection values, regardless of the supplemented concentrations (Table 5).

Table 5: Immunological parameters pre and post-exposure with *Streptococcus agalactiae* via gavage in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after 54 days of feeding with a diet supplemented with benzoic acid 0.1% (AB_{0.1%}), benzoic acid 0.2% (AB_{0.2%}), benzoic acid 0.3% (AB_{0.3%}) or unsupplemented (control_{0%}). Total plasmatic protein concentration (mg mL⁻¹) and total plasmatic immunoglobulin concentration (mg mL⁻¹). Data are presented as means and standard deviations, analyzed by ANOVA bifactorial.*

	Total Protein (mg L ⁻¹)		Total Immunoglobulin (mg L ⁻¹)	
	Pre infection	Post infection	Pre infection	Post infection
Control_{0%}	20.77±2.19 ^{Aab}	11.53±1.01 ^{Bb}	12.60±1.95 ^{Ab}	7.58±0.81 ^{Bdc}
AB_{0.1%}	28.44±4.65 ^{Aa}	12.31±0.89 ^{Bab}	16.85±1.80 ^{Ab}	6.74±1.60 ^{Bd}
AB_{0.2%}	21.70±4.37 ^{Aab}	20.71±8.49 ^{Bab}	11.42±1.26 ^{Abc}	9.59±1.61 ^{Bbcd}
AB_{0.3%}	21.74±6.02 ^{Aab}	12.43±2.33 ^{Bb}	12.23±1.73 ^{Ab}	6.99±1.13 ^{Bd}

p value from Total Protein: *p* Pre or post >0.0001; *p* Treatment 0.1386; *p* Interaction 0.0425.

p value from Total Immunoglobulin: *p* Pre or post >0.0001; *p* Treatment 0.0885; *p* Interaction 0.0011.

*Capital letters represent the difference between pre and post-exposure by Tukey test (*p* <0.05).

** Small letters represent the difference between interections by Tukey test (*p* <0.05).

With respect to agglutination activity, there was an increase in agglutinin molecules during pre-infection and no significant differences between treatments, which demonstrates that benzoic acid promoted good protection against the pathogenic microorganism (Table 6). In addition, there was an increase in antimicrobial activity during post-infection and no significant differences between treatments. This result demonstrates a good response of antimicrobial peptides against the pathogen (Table 6).

Table 6: Immunological parameters pre and post-exposure with *Streptococcus agalactiae* via gavage in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after 54 days of feeding with a diet supplemented with benzoic acid 0.1% (AB_{0.1%}), benzoic acid 0.2% (AB_{0.2%}), benzoic acid 0.3% (AB_{0.3%}) or unsupplemented (control_{0%}). Title agglutination concentration (Log₂ (x+1)) and title antimicrobial concentration (Log₂ (X+1)). Data are presented as means and standard deviations, analyzed by ANOVA bifactorial.*

	Title Agglutination		Title Antimicrobial	
	Pre infection	Post infection	Pre infection	Post infection
Control_{0%}	2.60±0.48 ^{Aa}	0.77±0.5 ^{Ba}	3.47±0.52 ^{Ba}	4.72±0.55 ^{Aa}
AB_{0.1%}	2.98±1.82 ^{Aa}	0.77±0.5 ^{Ba}	3.47±0.52 ^{Ba}	5.69±0.56 ^{Aa}
AB_{0.2%}	2.39±1.18 ^{Aa}	1.37±0.97 ^{Ba}	3.62±0.52 ^{Ba}	4.33±0.89 ^{Aa}
AB_{0.3%}	1.98±1.06 ^{Aa}	0.97±0.6 ^{Ba}	3.85±0.84 ^{Ba}	4.81±0.92 ^{Aa}

p value from Title Agglutination: *p* Pre or post >0.0001; *p* Treatment 0.8925; *p* Interaction 0.7198.

p value from Title Antimicrobial: *p* Pre or post >0.0001; *p* Treatment 0.3788; *p* Interaction 0.2124.

*Capital letters represent the difference between pre and post-exposure by Tukey test (*p* <0.05).

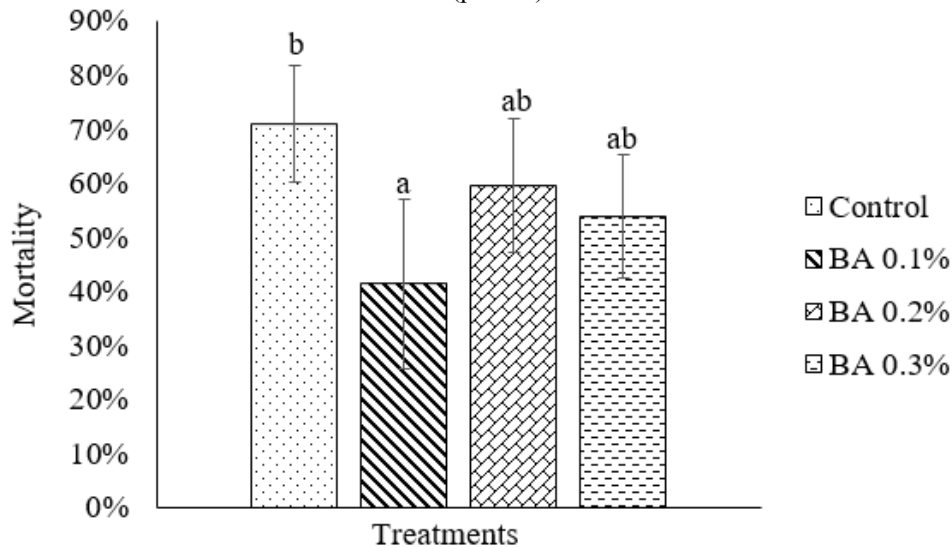
** Small letters represent the difference between treatment by Tukey test (*p* <0.05).

2.3.5 *Streptococcus agalactiae* challenge

Supplementation with different concentrations of benzoic acid significantly influenced the survival of Nile tilapia following the challenge via gavage with *S. agalactiae* (Figure 2). The group supplemented with BA_{0.1%} presented a lower percent mortality, 41 ± 16%, compared

with the control group ($71 \pm 11\%$). Therefore, this group (BA_{0.1%}) exhibited a survival of approximately 59%. The other concentration groups had intermediate survival.

Figure 2: Mortality of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* 54 days after feeding with diet supplemented with 0.1% benzoic acid (BA_{0.1%}), 0.2% benzoic acid (BA_{0.2%}), 0.3 benzoic acid (BA_{0.3%}) or not supplemented (control_{0%}), and followed by an experimental challenge with *Streptococcus agalactiae* (1×10^9 CFU mL⁻¹) via gavage. Data are presented as mean \pm standard deviation. *Different letters indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).



2.4 DISCUSSION

Fish fed diet supplemented with BA_{0.1%} showed the best zootechnical performance, such as better feed conversion and higher specific growth rates, when compared with non-supplemented controls, which corroborates other studies using different organic acids. For example, the results of Pereira et al. (2018) showed that silver catfish *Rhamdia quelen* fed diet supplemented with 0.25% calcium propionate had better zootechnical indexes when compared with unsupplemented fish. The same was observed by Agouz et al. (2015), who found that Nile tilapia fed a mixture of malic and oxalic acids and a mixture of sodium acetate with lactate in all tested doses (0.5%, 1% and 1.5%) showed significant improvements in zootechnical performance when compared with unsupplemented fish. The authors found that fish fed a mixture of 1% malic acid with oxalic presented greater weight gain, body length and specific growth rate.

Thus, the concentrations and types of organic acids have been shown to have a beneficial effect on the supplemented fish. For example, high concentrations of a given acidifier can lead to improvements in growth performance, whereas another can be harmful.

Benzoic acid is classified as a phenolic compound; it has an aromatic ring, which gives stability to its molecule and one or more hydroxyl substitutes, which promote a multifunctional structure and contribute to its action against pathogens (Angelo and Jorge, 2007). In the present study, the use of 0.3% benzoic acid did not promote the best production rates. One explanation for this is offered by De Freitas et al. (2006), who emphasize that small changes in *pH* are capable of compromising metabolic and physiological functions in the body.

However, the use of 3% citric acid in diets given to rohu *Labeo rohita* juveniles promoted increased weight gain and a higher specific growth rate (Baruah et al. 2007). It was also possible to observe the result of differential dosing in a study by Lim et al. (2010), where they found that Nile tilapia fed diets supplemented with 1% potassium diformate showed better weight gain and feed efficiency than groups fed with higher concentrations. Different results were obtained by Zhou et al. (2009), who did not observe significant differences between experimental groups supplemented or not with potassium diformate in four different concentrations (0.3; 0.6; 0.9 and 0.12%). Such differences may be explained by differences in the culture conditions, species of fish or terrestrial animal, handling and concentrations and species of organic acid used.

The improvement in the zootechnical indices observed in the present study could be explained by acidification, which improves the palatability of the diet, culminating in higher food intake and, consequently, greater weight gain, as argued by Partanen and Mroz (1999). However, each organic acid has different effects on the diet, such as formic acid, which has a positive effect on palatability but a very strong odour and taste and, when added in excess, reduces palatability, which reflects in slower growth (Partanen and Mroz, 1999).

As explained by Henry et al. (1985), high amounts of acids in the diet can cause acid-base disorders, which leads to metabolic acidosis and, as a consequence, lower feed consumption. This fact explains the differences in the growth performance of tilapia in relation to the doses administered, where the highest concentration, 0.3%, showed less dramatic results. For this reason, the concentration of 0.3% benzoic acid for Nile tilapia may have caused acid-base imbalance, as well as interfering in adaptability, culminating in the observed zootechnical indices. On the other hand, 0.1% supplementation of the diet was adequate for Nile tilapia and increased the growth parameters (Table 3).

Haematological analysis is an important tool for assessing the quality of the animals' diet, assessing their health conditions, assessing substance toxicity, as well as fish diagnosis. Among the assessed blood variables, haemoglobin and haematocrit values are the most influenced by diet (Agouz et al. 2015). After the feeding period, fish fed BA_{0.3%} had a mean

haemoglobin concentration equal to that of unsupplemented fish and higher than that of fish supplemented with BA_{0.1%}. Similar results were observed by Jaafar et al. (2013), where rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed diet supplemented with a 0.6% mixture of organic acids containing propionic, formic and silica dioxide after 14 days also showed high levels of haemoglobin, when compared to other diets offered not containing organic acids. This evidence confirmed that the type of organic acid, its applied concentration and the time of administration influences the fish's haematopoiesis, but the exact mechanism by which this occurs is not yet known.

Regarding the WBC count, fish fed diet supplemented with BA_{0.1%} presented leucocytosis and lymphocytosis relative to fish fed BA_{0.2%}, which showed a greater capacity to maintain homeostasis, since leukocytes are defence cells and generate an immune response, and lymphocytes are important cells for humoral and mediated immunity in fish, capable of recognizing and controlling an infection.

This increase in the WBC count was also verified by Azevedo et al. (2016), who observed higher values of total leukocytes in Nile tilapia during the autumn period, showing that such values are susceptible to both intraspecific and interspecific variation, pointing out that an increase in the number of WBC in the blood is an indicator of a stronger immune response. Azevedo et al. (2016) also suggested that lymphocytosis is an immunogenic stimulus of the organism.

In immunological analyses, there was an increase in total proteins in the pre-infection group supplemented with BA_{0.1%}. The same occurred with Pereira et al. (2018) in silver catfish fed diet supplemented with the lowest calcium concentration of propionic acid (0.25%) and also in the study by Soltan et al. (2017) with Nile tilapia supplemented with a blend of malic and oxalic acids, when compared with the control group. This shows that the fish responded positively to the supplementation, the total plasma protein being a form of evaluation for the basic nutritional status of the fish (Soltan et al. 2017). Total protein is also an important parameter in the non-specific immune system (De Souza et al. 2019).

Regarding the levels of antimicrobial peptide, they were higher in the post-infection phase, with no significant differences between treatments, which shows an increase in the antimicrobial activity delivered by benzoic acid. Antimicrobial peptides are essential for the innate immune system, as explained by Uribe et al. (2011). Due to the limitations of the adaptive immune system, innate immunity is extremely important for fish, being composed of several mechanisms involving humoral, cellular and tissue factors and antimicrobial peptides, for

example. In addition, the innate response precedes the adaptive one and contributes to the maintenance of homeostasis (Magnadóttir, 2006).

Immunoglobulins are molecules of the humoral response important for the adaptive system, as they depend on the major histocompatibility complex (MHC) (Magnadóttir, 2006). In this study, the highest levels of immunoglobulins were present in the pre-infection phase with the BA_{0.1%}-supplemented fish being efficient at stimulating the adaptive system to the treatment. As for agglutinating titer, agglutinins are type C lectins that contribute to opsonization, phagocytosis and activation of the complement system (Magnadóttir, 2006). In contrast, Pereira et al. (2018) used propionic acid in the diet of silver catfish and observed that the levels of agglutination increased after a challenge with *Aeromonas hydrophila*. In the present study, the levels of agglutinins were higher in the pre-infection stage. The aforementioned results show that the type of organic acid and species of fish must be taken into account.

Our results reinforce the study by Sakai (1999), which showed that immunostimulants promoted increased non-specific defence mechanisms. In relation to survival, fish fed supplemented diet containing BA_{0.1%} showed the highest rate, when compared with other groups. Similar results were observed by Ng et al. (2009), who used red tilapia (*Oreochromis* sp.) fed a mixture of organic acids containing formic acid, formate and potassium at 0.1%, 0.2% and 0.3% after a challenge with *S. agalactiae*. They found lower mortality rates compared with those of unsupplemented fish. This increase in the survival of fish fed diet supplemented with organic acids could be related to the antimicrobial activity of acids in their dissociated and non-dissociated form. Such a shape allows a direct mode of action to reduce the cytoplasmic *pH*, which causes the inhibition of bacterial cell metabolism. In order to restore the ideal *pH*, the bacterial cell goes into energy depletion and generates the accumulation of weak anions that are responsible for inhibiting growth in low *pH* organic acids and subsequent death of the bacterial cells (Pereira et al. 2018; Ng and Koh, 2016).

2.5 CONCLUSIONS

The study concluded that the addition of benzoic acid in the Nile tilapia diet positively influences zootechnical, health and survival parameters, with the 0.1% concentration being more suitable for inclusion in the Nile tilapia diet, together with good management practices for the best efficiency of the organic acid used.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

- Agouz, H., Soltan, M., Meshrf, R., 2015. Effect of some organic acids and organic salt blends on growth performance and feed utilization of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*). Egypt. J. Nutrition and Feeds. 18, 443–450. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2015.104519>
- Alemayehu, T.A., Geremew, A., Getahun, A., 2018. The Role of Functional Feed Additives in Tilapia Nutrition. Fisheries and Aquaculture Journal. 09. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000249>
- Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science. 32, 195–206.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T., 2000. Effects of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Science. 66, 1068–1075. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00170.x>
- Angelo, P., Jorge, N., 2007. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz. URL http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt (accessed 10.17.20)
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists, in: Cunniff, P.A. (Ed.), Official Methods of Analysis of the AOAC International. AOAC International, Artlingaton.
- Azevedo, T.M., Albinati, R.C., Guerra-Santos, B., Pinto, L.F., Lira, A., Medeiros, S.D., Ayres, M.C., 2016. Valores de referência dos parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) cultivados em tanques-rede em Paulo Afonso, no estado da Bahia, Brasil. Brazilian Journal Aquatic Science and Technology. 20. <https://doi.org/10.14210/bjast.v20n1>
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D., Mukherjee, S.C., 2007. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. Aquaculture Research. 38, 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology. 5, 771–781. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x>
- Boyd, C.E., Pillai, V.K., 1984. Water quality management in aquaculture, special publication, number 22, Cochin.
- Culot, A., Grosset, N., Gautier, M., 2019. Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review. Aquaculture 513, 734423. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734423>
- De Freitas, L.S., Lopes, D.C., De Freitas, A.F., Carneiro, J.D.C., Corassa, A., Pena, S.D.M., Costa, L.F., 2006. Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days old. Revista Brasileira de Zootecnia. 35, 1711–1719. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982006000600019>
- De Souza Silva, L.T., De Pádua Pereira, U., De Oliveira, H.M., Brasil, E.M., Pereira, S.A., Chagas, E.C., Jesus, G.F.A., Cardoso, L., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2019. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita*

after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 506, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.035>

Facimoto, C.T., Chideroli, R.T., Gonçalves, D.D., Do Carmo, A.O., Kalaphotakis, E., Pereira, U.P., 2017. Whole-Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain S13, Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. *Genome Announcements*. American Society for Microbiology. 5 (35) 00917-17.

Figueiredo, H.C.P., Carneiro, D.O., Faria, F.C., Costa, G.M., 2006. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58, 678–680. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000400036>

Gheler, T.R., Araújo, L.F., da Silva, C.C., Gomes, G.A., Prata, M.F., Gomide, C.A., 2009. Use of benzoic acid for piglets. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38, 2182–2187. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001100016>

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*. 56, 35–39.

Han, Q.F., Zhao, S., Zhang, X.R., Wang, X.L., Song, C., Wang, S.G., 2020. Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China. *Environment International*. 138, 105551. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105551>

Henry, R.W., Pickard, D.W., Hughes, P.E., 1985. Citric acid and fumaric acid as food additives for early-weaned piglets. *Animal Production*. 40, 505–509. <https://doi.org/10.1017/S0003356100040204>

Jaafar, R.M., Kania, P.W., Larsen, A.H., Nielsen, D.S., Fouz, B., Browdy, C., Buchmann, K., 2013. Gut microbiota changes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during organic acid feed supplementation and *Yersinia ruckeri* infection. *Journal of Fish Diseases*. 36, 599–606. <https://doi.org/10.1111/jfd.12047>

Khajepour, F., Hosseini, S.A., 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquaculture Research*. 43, 407–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02843.x>

Kim, D.B., Jang, G.J., Yoo, M., Lee, G., Yun, S.S., Lim, H.S., Kim, M.K., Lee, S., 2018. Sorbic, benzoic and propionic acids in fishery products: a survey of the South Korean market. *Food Additives & Contaminants. Part A* 35, 1071–1077. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1447692>

Lazzari, R., Neto, J.R., Corrêia, V., Veiverberg, C.A., Bergamin, G.T., Emanuelli, T., Ribeiro, C.P., 2011. Stocking density in growth, composition and body lipid profile of jundiá. *Ciência Rural*. 41, 712–718. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011000400027>

Lim, C., Klesius, P., Lückstädt, C., 2010. Effects of dietary levels of potassium diformate on growth, feed utilization and resistance to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *ISFNF 2010*. P-320.

- Loddi, M.M., Gonzales, E., Takita, T.S., Mendes, A.A., De Oliveira Roça, R., 2000. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29, 1124–1131. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982000000400025>
- Lückstädt, C., 2008. A sustainable alternative to antibiotics : Using acidifiers in fisheries & aquaculture. *Animal Nutrition*. 37–39.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Mo, X.B., Wang, J., Guo, S., Li, A.X., 2019. Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 518. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734774>
- Ng, W.-K., Koh, C.-B., 2016. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Aquaculture*. 0, 1–27.
- Ng, W., Koh, C., Sudesh, K., Siti-Zahrah, A., 2009. Organic acids potential replacement for antibiotic treatments of tilapia. *Global Aquaculture Advocate*. URL <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/organic-acids-potential-replacement-antibiotic-treatments-tilapia/> (accessed 10.19.20).
- NRC. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/13039>
- Oliveira, P.H.R., Reis, R. da R., 2017. Ácido Benzóico (CAS 65-85-0). *Revista Virtual da Química*. 9 (6).
- Owatari, M., Jesus, G.F., Filho, M.E.S., Lapa, K., Martins, M., Mouriño, J.L., 2018. Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquacultural Engineering*. 82, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.001>
- Partanen, K.H., Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*. 12, 117–145. <https://doi.org/10.1079/095442299108728884>
- Pereira, S.A., Oliveira, H.M., Jesus, G.F.A., Addam, K.G.S., Silva, B.C., Yamashita, M.M., Lehmann, N.B., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2018. Can the minerals calcium and sodium, chelated to propionic acid, influence the health and zootechnical parameters of native silver catfish *Rhamdia quelen*?. *Aquaculture*. 496, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.016>
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B. de, Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. EDUEM, Maringá.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172, 63–92. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00436-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00436-0)
- Silva, B.C., Marchiori, N., 2018. Importância do manejo alimentar na criação de tilápia. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural Santa Catarina.
- Silva, B.C., Jesus Gabriel Fernandes Alves, Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2017. Ácidos Orgânicos: Uma nova ferramenta nutricional para a aquicultura. *Aquaculture Brasil*. 32–39.

- Silva, B.C., Martins, M.L., Jatobá, A., Neto, C.C.B., Vieira, F.N., Pereira, G. V., Jerônimo, G.T., Seiffert, W.Q., Mouriño, J.L.P., 2009. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29, 869–873. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2009001100002>
- Silva, R.F. da, Lanna, E.A.T., Bomfim, M.A.D., Ribeiro, F.B., Júnior, F.I. de A., Navarro, R.D., 2008. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. *Revista Ceres*. 55, 352–355.
- Soltan, M.A., Hassaan, M.S., Meshrf, R.N., 2017. Response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to diet acidification: Effect on growth performance and feed utilization. *Journal of Applied Aquaculture*. 29, 207–219. <https://doi.org/10.1080/10454438.2017.1357063>
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinárni Medicina*. 56, 486–503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>
- Viola, E.S., Vieira, S.L., 2007. Supplementation of organic and inorganic acidifiers in diets for broiler chickens: Performance and intestinal morphology. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36, 1097–1104. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000500016>
- Zhou, Z., Liu, Y., He, S., Shi, P., Gao, X., Yao, B., Ringo, E., 2009. Effects of dietary potassium diformate (KDF) on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). *Aquaculture*. 291, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.043>

3 CONCLUSÃO GERAL

Pode-se concluir que é de suma importância o conhecimento do modo de ação de cada ácido orgânico e da espécie de peixe a ser trabalhada, além de boas práticas de manejo para oferecer a melhor concentração do aditivo para a influência positiva nos parâmetros zootécnicos e sanitários. Com a presente pesquisa, observou-se influência positiva do ácido benzoico a 0,1% nos parâmetros zootécnicos, saúde e sobrevivência após desavio experimental com *S. agalactiae* soro tipo B via gavagem.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de ácidos orgânicos como produtos alternativos aos antibióticos para a aquicultura como forma de melhorar a imunidade dos animais e, conseqüentemente alavancar sua produção, é uma fonte promissora. No presente estudo, a duração do experimento foi menor que o previsto, principalmente devido a biomassa de animais que ultrapassou o limite suportado pelo sistema.

Em relação a investigação de ácidos orgânicos para a aquicultura, precisa de muitos estudos acerca de qual o melhor ácido orgânico para cada espécie de peixe, bem como suas doses e a forma como esse aditivo devem ser acrescentados na suplementação dos animais. Neste estudo, não foi possível inocular o ácido benzoico junto a formulação, mas seria muito interessante realizar esse tipo de incorporação em trabalhos futuros. Outro fator a ser levado em consideração em pesquisa seria investigar outras formas de incorporação na ração, um exemplo, a microencapsulação, afim de verificação se há um melhor aproveitamento da suplementação, bem com a utilização de menores concentrações do princípio ativo e até mesmo, um período menor ou maior de teste.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ALEMAYEHU, T. A.; GEREMEW, A.; GETAHUN, A. The Role of Functional Feed Additives in Tilapia Nutrition. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 09, n. 02, 2018.
- AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195–206, 2011.
- ARAÚJO, G.S., RODRIGUES, J.A.G., DA SILVA, J.W.A., FARIAS, W.R.L. Cultivation of Nile Tilapia at different stocking densities in round net cages. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, p. 428-434, 2010.
- ARUETY, T., BRUNNER, T., RONEN, Z., GROSS, A., SOWERS, K., ZILBERG, D. Decreasing levels of the fish pathogen *Streptococcus iniae* following inoculation into the sludge digester of a zero-discharge recirculating aquaculture system (RAS). **Aquaculture**, 2015.
- AZEVEDO, V.G., NETO, H.G., ALMEIDA, H.L.P.S., SANCHES, E.G. **Sistemas de Recirculação para Cultivo de Peixes Marinhos- Procedimento Operacional Padrão (POP)** -. 2014. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/Sist_RecirculacaoCultivodePeixesMarinhos14.pdf. Acesso em: 28 fev 2021.
- BIK, E.M. Composition and function of the human-associated microbiota. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 2, p. 164-177, 2009.
- BÜHLER, K. Benzoic acid as feed additive in pig nutrition. Effects of diet composition on performance, digestion and ecological aspects. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - **Instituto Federal de Tecnologia de Zurique**, Zurique, 2009.
- BURNELL, T.W., CROMWELL, G.L., STAHLY, T.S. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1100-1108, 1988.
- CHIDEROLI, R. T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, n. March, p. 45–51, 2017.
- CULOT, A.; GROSSET, N.; GAUTIER, M. Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 513, p. 734423, 2019.
- DE FREITAS, L. S. et al. Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days old. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1711–1719, 2006.
- DIAO, H., GAO, Z., YU, B., ZHENG, P., HE, J., YU, J., HUANG, Z., CHEN, D., MAO, X. Effects of benzoic acid (VevoVital[®]) on the performance and jejunal digestive physiology in young pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 32, 2016.
- EVANS, J. J. et al. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 774–776, 2009.

EVARISTE, L., BARRET, M., MOTTIER, A., MOUCHET, F., GAUTHIER, L., PINELLI, E. Gut microbiota of aquatic organisms: A key endpoint for ecotoxicological studies. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 989-999, 2019.

FEFANA. Organic acids in animal nutrition. 2014 Disponível em: <https://fefana.org/publication/organic-acids-in-animal-nutrition/>. Acesso em 20 nov 2020.

FIB. Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos. **Food Ingredients Brasil**. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/artigos/acidulantes/aplicacoes-do-acido-citrico-na-industria-de-alimentos>. Acesso em: 15 dez 2020.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678–680, 2006.

FIGUEIREDO, H.C.P. Sanidade Aquícola - Imunidade de Animais Aquáticos. **Panorama da Aqüicultura**, ed 106, 2008. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/sanidade-aquicola-imunidade-de-animais-aquaticos/>. Acesso em: 08 fev 2021.

FLORES, F., LOVATO, M., WILSMANN, C.G., GAZONI, F.L., SILVEIRA, F., CARON, L.F., BEIRÃO, B.C.B. Behavior of cells of immune system to the challenge with *Salmonella Enteritidis* in birds treated and untreated with organic acids. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, 2012.

GALASSI, G. et al. Effects of benzoic acid on nitrogen, phosphorus and energy balance and on ammonia emission from slurries in the heavy pig. **Italian Journal of Animal Science**, v. 10, n. 3, p. 200–204, 2011.

GUGGENBUHL, P., SÉON, A., QUINTANA, A.P., NUNES, C.S. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. **Livestock Science**, v. 108, p. 218-221, 2007.

HAN, Q. F. et al. Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China. **Environment International**, v. 138, n. January, p. 105551, 2020.

HOSSAIN, M.A., PANDEY, A., SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 73, p. 1309-1317, 2007.

IZVEKOVA, G., IZVEKOV, E.I., PLOTNIKOV, A.O. Symbiotic Microflora in Fishes of Different Ecological Groups. **Biology Bulletin**, v 34, n. 6, p. 610-618, 2007.

KHAJEPOUR, F.; HOSSEINI, S. A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 407–411, 2012.

KIEN, C.L., CHANG, J.C., COOPER, J.R. Butyric Acid Is Synthesized by Piglets. *American Society for Nutritional Sciences*, 1999.

KIM, D. B. et al. Sorbic, benzoic and propionic acids in fishery products: a survey of the South

Korean market. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 35, n. 6, p. 1071–1077, 2018.

KOH, C.-B., ROMANO, N., ZAHRAH, A.S., NG, W.-K. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 357-369, 2016.

KUBITZA, F., KUBITZA, L.M.M. Principais Parasitoses e Doenças em Tilápias. **Panorama da Aqüicultura**, 2000. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/principais-parasitoses-e-doencas-em-tilapias/>. Acesso em: 10 out 2020.

LEIRA, M.H., LAGO, A.A., BOTELHO, H.A., MELO, C.C.V., MENDONÇA, F.G., NASCIMENTO, A.F., FREITAS, R.T.F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil - uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016^a.

LEIRA, M.H., REGHIM, L.S., BOTELHO, H.A., CUNHA, L.T., MELO, C.C., NASCIMENTO, A.F., VRAZ, M.S., FREITAS, R.T.F. *Streptococcus* sp em peixes criados no sistema de policultivo na Região Sul do Estado de Minas Gerais. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 2, p. 092-097, 2016^b.

LEIRA, M.H., REGHIM, L.S., CIACCI, L.S., CUNHA, L.T., BOTELHO, H.A., BRAZ, M.S., DIAS, N.P., MELO, C.C.V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **Pubvet Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 2, p. 538-544, 2017.

LEHNEN, C.R., LOVATTO, P.A., ZANELLA, I., ROSSI, C.A., HAUSCHILD, L., MELCHIOR, R. Lactating sows fed diets with high moisture corn silage and fumaric acid. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n.1, 2011.

LÜCKSTÄDT, C. A sustainable alternative to antibiotics: Using acidifiers in fisheries & aquaculture. **Animal Nutrition**, p. 37–39, 2008.

MACHADO, P.R.L., ARAÚJO, M.I.A.S., CARVALHO, L., CARVALHO, E.M. Immune response mechanisms to infections. **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137–151, 2006.

MAIORKA, A. SANTIN, A.M.E., BORGES, S.A., OPALINSKI, M., SILVA, A.V.F. Evaluation of a mix of fumaric, lactic, citric and ascorbic acids on start diets of broilers. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 31-37, 2004.

MAPA. **Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-13-de-30-de-novembro-de-2004.pdf/view>. Acesso em: 28 jun 2020.

MARENGONI, N.G., MACHADO, L.M.C., OLIVEIRA, C.A.L., YOSHIDA, G.M.,

KUNITA, N.M., RIBEIRO, R.P. Morphological traits and growth performance of monosex male tilapia GIFT strain and Saint Peter. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3399-3410, 2015.

MERRIFIELD, D., RINGO, E. Aquaculture Nutrition. Gut Health, Probiotics and Prebiotics. Reino Unido: **John Wiley & Sons**, Ltd, 2014.

MIAN, G. F. et al. Evaluation of resistance against *Streptococcus agalactiae* in four farmed strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 1, p. 351–355, 2020.

MURPHY, D.P., O'DOHERTY, J.V., BOLAND, T.M., O'SHEA, C.J., CALLAN, J.J., PIERCE, K.M., LYNCH, M.B. The effect of benzoic acid concentration on nitrogen metabolism, manure ammonia and odour emissions in finishing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 163, p. 194-199, 2011.

NG, W.-K.; KOH, C.-B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Aquaculture**, v. 0, p. 1–27, 2016.

NG, W.-K., KOH, C.-B., SUDESH, K., SITI-ZAHRAH, A. Organic acids potential replacement for antibiotic treatments of tilapia. **Global Aquaculture Alliance**, 2009. Disponível em: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/organic-acids-potential-replacement-antibiotic-treatments-tilapia/>. Acesso em: 19 out 2020.

KOH, C.-B., ROMANO, N., SITI-ZAHRAH, A., NG, W.-K. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 357-369, 2016.

NG, W.-K., KOH, C.-B. Organic acids in aquafeeds: A potential substitute for antibiotics. **Global Aquaculture Alliance**, 2018. Disponível em: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/organic-acids-aquafeeds-potential-substitute-antibiotics/>. Acesso em: 19 out 2020.

OLIVEIRA, V.M., ASSIS, C.R.D., BEZERRA, R.S. Fish digestive hydrolase: Biochemical, physiological and biotechnological aspects. **Revista Eletrônica de Biologia**, n. 7, v. 3, p. 330-341, 2014.

OLIVEIRA, P. H. R.; REIS, R. DA R. Ácido Benzóico (CAS 65-85-0). **Revista Virtual da Química**, v. 9, n. 6, 2017

OLIVEIRA, E.G. SANTOS, F.J.S. PEREIRA, A.M.L., LIMA, C.B. Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. **Circular Técnica**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/69806/producao-de-tilapia-mercado-especie-biologia-e-recria>. Acesso em: 10 dez 2020.

PANDEY, A., SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 74, p. 867-874, 2008.

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, p. 117–145, 1999.

PEIXEBR. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2019**, 2020.

PEREIRA, O.G., DE SOUZA, V.G., FILHO, S.C.V., PEREIRA, D.H., RIBEIRO, K.G., CECON, P.R. Consumo e digestibilidade dos nutrientes e desempenho de bovinos de corte recebendo dietas com diferentes níveis de uréia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 552-562, 2008.

PEREIRA, S. A. et al. Can the minerals calcium and sodium, chelated to propionic acid, influence the health and zootechnical parameters of native silver catfish *Rhamdia quelen*? **Aquaculture**, v. 496, p. 88–95, 2018.

PEREIRA, S.A., JESUS, G.F.A., PEREIRA, G.V., SILVA, B.C., SÁ, L.S., MARTINS, M.L., MOURIÑO, J.L.P. The Chelating Mineral on Organic Acid Salts Modulates the Dynamics and Richness of the Intestinal Microbiota of a Silver Catfish *Rhamdia quelen*. **Current Microbiology**, 2020.

RINGO, E., OLSEN, R.E., CASTELL, J.D. Effect of Dietary Lactate on Growth and Chemical Composition of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25, n. 3, 1994.

RINGO, E. Probiotics in shellfish aquaculture. **Aquaculture and Fisheries**, 2019.

ROBINSON, J.A., MEYER, F.P. Streptococcal Fish Pathogen. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 2, p.512, 1966.

ROMERO, J., RINGO, E., MERRIFIELD, D.L. The Gut Microbiota of Fish. **Aquaculture Nutrition**, 2014.

SANAR. Piscicultura: criação de tilápias em viveiros escavados. **Coleção Senar 210**, 2018.

SHEN, X., JIN, G., ZHAO, Y., SHAO. Prevalence and distribution analysis of antibiotic resistance genes in a large-scale aquaculture environment. **Science of the Total Environment**, 2019.

SILVA, B.C., VIEIRA, F.N., MOURIÑO, J.L.P., SEIFFERT, W.Q., BOLIVAR, N. MARTINS, M.L. Ácidos e sais orgânicos na aquicultura: seus efeitos na nutrição e saúde de organismos aquáticos. *In*:TAVARES-DIAS, M., MARIANO, W.S. (org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Volume 2, São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. p. 579-600.

SILVA, B. C. et al. Ácidos Orgânicos: Uma nova ferramenta nutricional para a aquicultura. **Aquaculture Brasil**, p. 32–39, 2017.

SILVA, R. F. DA et al. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 352–355, 2008.

TEIXEIRA, R.N.G., CORRÊA, R.O., FARIA, M.T., MEYER, G. Piscicultura em tanques-rede. Coleção Criar, 6. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, ed 1, 2009.

TORRALLARDONA, D., BADIOLA, I., BROZ, J. Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. **Livestock Science**, v. 108, n. 1, p. 210-213, 2007.

VAN IMMERSEEL, F., CAUWERTS, K., DEVRIESE, L.A., HAESBROUCK, F., DUCATELLE, R. Feed additives to control Salmonella in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, 2002.