



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

Gracienne Gomes dos Santos

**Mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido orgânico benzoico como suplementação dietética  
para tilápia-do-nilo**

Florianópolis

2021

Gracienne Gomes dos Santos

**Mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido orgânico benzoico como suplementação dietética  
para tilápia-do-nilo**

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. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño  
Coorientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Scheila Anelise Pereira

Florianópolis

2021

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

Santos, Gracienne Gomes dos

Mix probiótico Bacillus spp. e ácido orgânico benzoico como suplementação dietética para tilápia-do-nylo / Gracienne Gomes dos Santos ; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño, coorientadora, Scheila Anelise Pereira, 2021.

60 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. Piscicultura. 3. Tilapicultura. 4. Aditivo alimentar. 5. Saúde. I. Mouriño, José Luiz Pedreira. II. Pereira, Scheila Anelise. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Gracienne Gomes dos Santos

**Mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido orgânico benzoico como suplementação dietética para tilápia-do-nilo**

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

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

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

Bruno Corrêa 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, minha mãe, Graça, meu pai, Valdir, a minhas irmãs, Bruna e Marcela.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família que desde sempre me incentivaram e principalmente me apoiaram em ficar longe deles para realizar meus sonhos. Agradeço também minha amiga Roberta por todo incentivo e apoio neste tempo de moradia em Florianópolis.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño pela orientação durante este trabalho e pelos ensinamentos muito valiosos, sou grata pela oportunidade, confiança nesse tempo de mestrado e por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Agradeço a minha coorientadora e amiga Prof. Dr<sup>a</sup>. Scheila Anelise Pereira por todos os ensinamentos de bancada, todo cuidado e apoio durante experimento e a parte escrita. Obrigada, Sche por tudo neste tempo, aprendi muito com você. Toda a gratidão aqui mencionada ainda será pouca por tudo que fez por mim.

Agradeço também ao Prof. Dr. Maurício Laterça por todo apoio neste trabalho. Meu muito obrigada por toda disponibilidade e ajuda.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório por toda ajuda e ensinamentos de bancada, pelos cafês antes da pandemia e pelas mensagens positivas na pandemia. Grata por todos vocês: Tamires, Lúvia, Lucas, Paula, Domickson e Kenya, muito obrigada. Também ao Marco, Zé Victor, Mateus, Gustavo e ao César pelo apoio no experimento e a Sílvia (técnica do laboratório) por toda ajuda, sem vocês nada seria possível.

Obrigada aos professores da pós por grandes ensinamentos que contribuíram neste estudo e em meus conhecimentos para aquicultura. Também ao programa de pós-graduação em Aquicultura e toda a direção em especial ao Sr. Carlito por todo apoio sempre. Todos os funcionários da UFSC que cuidam da segurança, limpeza entre outros, em particular quero mencionar o Juliano, André e a Vânia que trabalham no NEPAQ.

Agradeço a minha parceira de mestrado e amiga Maria Clara, que junto dividiu comigo emoções, sentimentos, toda a parte experimental. Juntas compartilhamos forças durante todos os dias. Maria, não tenho palavras para agradecer por tudo neste tempo. É nós! AB+B rsrs.... Sou grata por você em minha vida.

Também a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, a empresa DSM e ao Laboratório de Bacteriologia em Peixes (LABBEP) da Universidade Estadual de Londrina pela bactéria cedida e utilizada no desafio neste estudo.

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

## RESUMO

No Brasil, a piscicultura em águas continentais é representada principalmente pela tilapicultura, destacando sua cadeia produtiva como uma das mais importantes para aqüicultura brasileira. No entanto, o aumento da incidência de doenças em sistemas de produção tem causado grandes perdas aos produtores, fazendo-se necessário o desenvolvimento de estratégias para o melhor desempenho produtivo e controle de microrganismos patogênicos no cultivo. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do mix probiótico *Bacillus* spp. e do ácido benzoico, sob o desempenho zootécnico e parâmetros hematoimunológicos de juvenis de tilápia-do-nylo, além de avaliar a resistência a doença e a atividade imunológica, após infecção com *Streptococcus agalactiae* via gavagem. Um total de 320 peixes foram distribuídos em quatro grupos com quatro repetições (20 peixes por unidade experimental) sendo alimentados durante 54 dias, com os seguintes grupos experimentais: controle, ração sem suplementação; ração suplementada com ácido benzoico (VevoVital®) a 0,1% (AB<sub>0,1%</sub>); ração suplementada com mix probiótico comercial (PureGro™) *Bacillus* spp. (B); e ração suplementada com mix probiótico *Bacillus* spp. em conjunto com o ácido benzoico 0,1% (B+AB<sub>0,1%</sub>). Os peixes alimentados com ácido benzoico 0,1% apresentaram melhores resultados para ganho de peso (48.33±5.23 g), biomassa final (1005,99±85,10 g), taxa de crescimento específico (4,14±0,08) e sobrevivência após exposição ao patógeno em relação ao grupo controle. Portanto, este grupo apresentou menor mortalidade (41,39±15,64%) em relação ao grupo controle (76,03 ± 4,90%). O número de trombócitos foi influenciado positivamente em todos os tratamentos AB<sub>0,1%</sub> (1,98 ± 0,96 µL<sup>-1</sup>), (B) (2,86 ± 1,12 µL<sup>-1</sup>), (B+AB<sub>0,1%</sub>) (3,17 ± 2,03 µL<sup>-1</sup>) em relação ao grupo controle (0,51 ± 0,28 µL<sup>-1</sup>). Atividade aglutinante foi maior (p<0.05) no grupo suplementado com mix probiótico *Bacillus* spp após-infecção experimental em relação aos outros grupos. Enfatiza-se que a suplementação de ácido benzoico 0,1% proporcionou melhores resultados para tilápia-do-nylo em desempenho zootécnico e sobrevivência ao desafio com *S. agalactiae* via gavagem. Além disso, este estudo é o primeiro a avaliar a suplementação conjunta de ácido benzoico e probiótico *Bacillus* spp. para tilápia-do-nylo, portanto, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos do ácido benzoico em conjunto com o probiótico *Bacillus* spp e outras concentrações de ácido benzoico que possibilitem efeito sinérgico para melhores resultados em ensaio *in vivo*.

**Palavras chaves:** Aqüicultura. Piscicultura. Tilapicultura. Aditivo alimentar. Saúde.

## ABSTRACT

In Brazil, fish farming in continental waters is mainly represented by tilaculture, highlighting its production chain as one of the most important for Brazilian aquaculture. However, the increased incidence of diseases in production systems has caused great losses to producers, making it necessary to develop strategies for better productive performance and control of pathogenic microorganisms in cultivation. The aim of the study was to evaluate the effects of the probiotic mix *Bacillus* spp. and benzoic acid, under the zootechnical performance and hematoimmunological parameters of Nile tilapia juveniles, in addition to evaluating disease resistance and immunological activity after infection with *Streptococcus agalactiae* via gavage. A total of 320 fish were distributed into four groups with four replications (20 fish per experimental unit) being fed for 54 days, with the following experimental groups: control, ration without supplementation; feed supplemented with 0.1% benzoic acid (VevoVital®) (BA<sub>0.1%</sub>); feed supplemented with commercial probiotic mix (PureGro™) *Bacillus* spp. (BAC); and feed supplemented with *Bacillus* spp. together with 0.1% benzoic acid (BAC+BA<sub>0.1%</sub>). Fish fed 0.1% benzoic acid showed better results for weight gain (48.33±5.23 g), final biomass (1005.99±85.10 g), specific growth rate (4.14± 0.08) and survival after exposure to the pathogen compared to the control group. Therefore, this group had lower mortality (41.39±15.64%) compared to the control group (76.03 ± 4.90%). The number of thrombocytes was positively influenced in all treatments BA<sub>0.1%</sub> (1.98 ± 0.96 μL<sup>-1</sup>), (BAC) (2.86 ± 1.12 μL<sup>-1</sup>), (BAC+BA<sub>0.1%</sub>) (3.17 ± 2.03 μL<sup>-1</sup>) compared to the control group (0.51 ± 0.28 μL<sup>-1</sup>). Binding activity was higher (p<0.05) in the group supplemented with *Bacillus* spp probiotic mix after experimental infection compared to the other groups. It is emphasized that 0.1% benzoic acid supplementation provided better results for Nile tilapia in zootechnical performance and survival to the challenge with *S. agalactiae* via gavage. Furthermore, this study is the first to evaluate the joint supplementation of benzoic acid and probiotic *Bacillus* spp. for Nile tilapia, therefore, further studies are needed to evaluate the effects of benzoic acid in conjunction with the probiotic *Bacillus* spp and other concentrations of benzoic acid that enable a synergistic effect for better results in an in vivo assay.

**Keywords:** Aquaculture. Pisciculture. Tilaculture. Food additive. Health.



## LISTA DE FIGURAS

### INTODUÇÃO GERAL

Figura 1 - Mecanismos usados pelo *Bacillus* contra patógenos na aquicultura ..... 22

### ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1 - Contagem microbiológica média da ração ( $\text{Log}_{10}$ ) do grupo não suplementado (controle), suplementado com apenas ácido benzoico 0,1%, suplementado apenas o mix probiótico *Bacillus* spp., ou suplementado com o mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido benzoico 0,1%, no início da inoculação (dia zero) e ao final da semana (7 dias). Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão. \*Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) \*\* Não houve diferença significativa entre os tratamentos os períodos (início e fim) ..... 35

Figura 2 - Curva de mortalidade de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* desafiada com *Streptococcus agalactiae* (CP018623) nas concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) via gavagem e intraperitoneal para cálculo da dose letal ..... 38

Figura 3 - Sobrevivência de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp. ou com ácido benzoico 0.1% em conjunto com *Bacillus* spp. após 54 dias, seguida de desafio experimental com *Streptococcus agalactiae* via gavagem ( $1 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) \*Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 41

Figura 4 - Parâmetros imunológicos pré e pós-infecção experimental com *Streptococcus agalactiae* via gavagem de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp. ou com ácido benzoico 0.1% em conjunto com *Bacillus* spp. durante 54 dias. A) Concentração de proteína total plasmática ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). B) Concentração de imunoglobulina total plasmática ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). C) Título Aglutinante ( $\log_2 (X+1)$ ). D) Título Antimicrobiano ( $\text{Log}_2 (X+1)$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, analisados por ANOVA bifatorial. Para os dados de proteína os valores de p foram: infecção  $< 0,001$ ; tipo de suplementação  $p=0,320$ ; interação  $p= 0,500$ . Para os dados de imunoglobulina os valores de p foram: infecção  $< 0,001$ ; tipo de suplementação  $p=0,975$ ; interação  $p= 0,614$ . \* Letras maiúsculas

representam diferença significativa entre pré e pós-infecção pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas representam diferentes diferença significativa da interação pelo teste de Tukey( $p < 0,05$ )..... 43

## **LISTA DE QUADROS**

- Quatro 1 - Funções e propriedades de microingredientes utilizados em dietas de animais .... 18
- Quatro 2 - Mecanismos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal ..... 25

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Formulação e composição centesimal (em matéria seca) da dieta base .....34
- Tabela 2 – Desempenho zootécnico de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp. ou com ácido benzoico 0,1% em conjunto com *Bacillus* spp. durante 54 dias. Os dados são apresentados em média e desvio padrão ..... 40
- Tabela 3 – Parâmetros hematológicos de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp ou com ácido benzoico 0.1% em conjunto com *Bacillus* spp. durante 54 dias. VCM: Volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média ... 42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	Piscicultura continental com ênfase em tilapicultura .....	14
1.2	Sanidade e entraves na tilapicultura .....	15
1.3	Aditivos alimentares na aquicultura .....	16
<b>1.3.1</b>	<b>Probióticos</b> .....	<b>18</b>
1.3.1.2	<i>Mecanismos de ação dos probióticos</i> .....	19
1.3.1.3	<i>Principais probióticos na piscicultura</i> .....	21
<b>1.3.2</b>	<b>Ácidos orgânicos e sais</b> .....	<b>22</b>
1.3.1.2	<i>Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos</i> .....	23
1.3.1.3	<i>Principais ácidos e ou sais orgânicos</i> .....	25
1.4	Influência da suplementação conjunta de probióticos e ácidos orgânicos .....	26
1.5	OBJETIVOS .....	28
<b>1.5.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>28</b>
1.6	ESTRUTURA DO TRABALHO .....	28
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>29</b>
2.1	Introdução .....	31
2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
<b>2.2.1</b>	<b>Material biológico</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Preparo das dietas Experimentais</b> .....	<b>33</b>
2.2.1.1	<i>Contagem microbiológica da ração</i> .....	34
<b>2.2.3</b>	<b>Desenho experimental</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Índices zootécnicos</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Exposição a <i>Streptococcus agalactiae</i> via gavagem</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Análises hematoimunológicos</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Análises imunológicas</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.8</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>39</b>
2.3	RESULTADOS .....	40
<b>2.3.1</b>	<b>Índices zootécnicos</b> .....	<b>40</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Exposição a <i>Streptococcus agalactiae</i> via gavagem</b> .....	<b>40</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Análises hematológicas</b> .....	<b>41</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Análises imunológicas</b> .....	<b>42</b>

2.4	DISCUSSÃO .....	43
2.5	CONCLUSÃO .....	47
2.6	AGRADECIMENTOS .....	47
	REFERÊNCIAS .....	48
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....</b>	<b>55</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PISCICULTURA CONTINENTAL COM ÊNFASE EM TILAPICULTURA

Nas últimas décadas, a aquicultura tem se destacado como uma das principais fontes da produção de alimento mundial, bem como, uma atividade relevante para geração de emprego e renda com alto potencial econômico (SIQUEIRA, 2018). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2020), a aquicultura mantém um crescimento acelerado desde o final dos anos 1980, o qual possibilitou que a atividade ultrapassasse a pesca, garantindo a oferta de pescado no mercado global. Dentre os segmentos da aquicultura, vale destacar a piscicultura, pois representa o grupo de animais mais produzidos, além de sua importante contribuição como fonte de proteína de alto valor biológico e de renda para os produtores (RODRIGUES; MEURER; BOSCOLO, 2015).

No Brasil a piscicultura em águas continentais é representada, principalmente, pela tilapicultura, sendo uma importante atividade agropecuária na geração de emprego e renda (ALBUQUERQUE et al., 2013), em 2019 segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de tilápia foi de 323,7 mil toneladas, ou 61,1% do total. De acordo com a Associação Brasileira de Piscicultura (Peixe BR, 2021) em um levantamento preliminar a produção de tilápia superou 6,2 milhões de toneladas em 2020, resultando em um crescimento estimado de 2% em relação a produção global. Além disso, vale ressaltar que essa produção foi obtida em um ano com grandes impactos decorridos da pandemia do novo coronavírus. Sendo assim, fica evidente que a tilápia é a espécie mais importante da piscicultura no Brasil, apresentando em 2020 uma produção de 486 mil toneladas, mantendo o Brasil na 4ª posição mundial na produção de tilápia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2021; FAO, 2020).

Dentre as espécies de tilápia a *Oreochromis niloticus* é um dos peixe mais cultivados em águas continentais e representa o segundo grupo com maior importância para aquicultura mundial (ALBUQUERQUE et al., 2013; BOSCOLO et al., 2004; PRABU et al., 2019). A tilapia apresenta algumas características desejáveis à exploração comercial, como: crescimento rápido, rusticidade, capacidade de adaptação a diversas condições ambientais garantindo seu crescimento e reprodução como também tolerância ao estresse induzido pelo manejo e poucas modificações no ambiente são necessários para o cultivo da espécie (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; PRABU et al., 2019; SANTOS; LOURENÇO; IGARASHI, 2007).

Entre as espécies de peixes cultivadas para fins industriais, a tilápia-do-nilo apresenta boa qualidade de filé por não apresentar espinhos em forma de ‘Y’, tornando assim, uma espécie

apropriada para indústria de filetagem e garantindo boa aceitação no mercado consumidor (HILSDORF, 1995; BOSCOLO et al. 2004).

## 1.2 SANIDADE E ENTRAVES NA TILAPICULTURA

Ao logo dos anos, com aumento da produção na piscicultura brasileira, tem-se observado intensificação de problemas relacionados à sanidade, o que dificulta a vida dos piscicultores brasileiros (LEIRA et al., 2017a). Por conseguinte, os cultivos com maior densidade de animais, predispõem os mesmos a fatores estressantes culminando em maior susceptibilidade a agentes patogênicos e que conseqüentemente grandes perdas econômicas (DOTTA; PIAZZA, 2012).

Na piscicultura continental brasileira as doenças são responsáveis por uma perda anual de cerca de 15%, que estima uma perda aproximadamente de US\$ 84 milhões provocada direta e indireta por doenças em estoque de cultivos (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). As principais causas de doenças no cultivo estão relacionadas ao desequilíbrio na relação patógeno, hospedeiro e meio-ambiente. Quando ocorre um desbalanço nesta relação, observa-se o desenvolvimento de enfermidades (DOTTA; PIAZZA, 2012; PEREIRA et al., 2017).

As enfermidades são causadas por diferentes agentes etiológicos e se manifestam nos animais de cultivo em virtude de diversos fatores como: debilitação do sistema imunológico; condições de estresse; má alimentação; e fatores abióticos, que podem resultar em grandes mortalidades nos cultivos (ALBUQUERQUE et al., 2015; HINDU et al., 2019). As principais doenças que acometem as pisciculturas comerciais, são causadas por: vírus, fungos, parasitos e bactérias (LEIRA et al., 2017a; TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009). Dentre estes agentes, as doenças bacterianas se destacam, pois proliferam-se rapidamente em ambientes aquáticos e podem persistir nos hospedeiros, sem provocar a doença, até que ocorra alguma alteração (estresse) capaz de causar danos ao sistema imune do animal, conseqüentemente, interfere na homeostase do organismo levando ao desenvolvimento da enfermidade (ANDRADE; SOUZA; MORAIS, 2017; MEIRELLES, 2010).

As enfermidades de cunho bacteriano tem se tornado preocupantes no Brasil e no mundo, pois são responsáveis por altas taxas de mortalidade e quando não levam ao óbito do animal pode deixar lesões que inviabilizam sua comercialização, trazendo grandes prejuízos econômicos (LEIRA et al., 2017b). As bactérias patogênicas com maior impacto para produção comercial de peixes em cultivo, principalmente em tilápias são: *Streptococcus* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium columnare*, *Yersinia ruckeri*; *Francisella* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Piscirickettsia salmonis*, e *Vibrio*



*spp.*, (KUBITZA, 2005; LEIRA et al., 2017b; YAMASHITA, 2015). Dentre estas, as infecções causadas por *Streptococcus* sp, são as mais relevantes para tilapicultura, pois contribuem para graves perdas econômicas. Contudo, sabe-se que este gênero não acometem exclusivamente as tilápias, sendo reportada como patogênica para uma gama de hospedeiros, como: seres humanos, aves, peixes de água doce e marinha (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; LEIRA et al., 2017).

Além disso, independente do animal infectado, a doença causada por este gênero, designa-se estreptococose. Em relação as principais espécies bacterianas causadoras de estreptococose com registro para tilápia no mundo, cita-se: *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011), sendo que esta última, é a de maior prevalência (ASENCIOS et al., 2016). Segundo Leira et al. (2017) A *Streptococcus agalactiae* principalmente do grupo B é uma bactéria com importância para humanos sendo associada a casos de meningoencefalites em recém-nascidos, e em bovinos, esse microrganismo é responsável por quadros de mastite clínica e subclínica. Nas últimas décadas essa bactéria tem se destacado como patógeno emergente na piscicultura.

Tilápias com estreptococose mostraram diferentes sinais clínicos (CONROY, 2009), sendo os mais comuns: movimentação errática e natação desorientada; anorexia; letargia; melanose da pele; petéquias, lesões hemorrágicas e necróticas na pele e tecido muscular, hiperemia da região anal e nas nadadeiras; exoftalmia unilateral ou bilateral com ou sem sangramento; opacidade da córnea e periocular (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; CONROY, 2009; LEIRA et al., 2017b).

Embora, as tilápias sejam resistentes a diversos fatores estressantes no cultivo, elas podem ser expostas ao surgimento de doenças (MEIRELES, 2010). Diante disso, boas práticas de manejo podem prevenir mortalidades, assim como, boas condições nutricionais, uma vez que, possuem um papel importante sobre o sistema imune dos animais (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

### 1.3 ADITIVOS ALIMENTARES NA AQUICULTURA

Para minimizar os problemas relacionados a enfermidades em peixes, várias pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos com o intuito de melhorar a performance zootécnica e resistência a doenças. Dentre os métodos alternativos pode-se destacar o uso dos aditivos na alimentação, como por exemplo: os probióticos, prebióticos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, entre outros (ALBUQUERQUE et al., 2013).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 1999), aditivo alimentar é todo e qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (BRASIL, 1999). Outra definição da legislação brasileira é a Instrução Normativa número 13 de 30 de novembro de 2004 publicada no Diário Oficial da União em 2004 (BRASIL, 2004), que regulamenta aditivos alimentares para uso animal como: substâncias ou microrganismos adicionados intencionalmente, que normalmente não se consomem como alimento, tenham ou não valor nutritivo, que afetem ou melhorem as características do alimento ou dos produtos animais (CAVALHEIRO et al., 2014; SILVA; GALÍCIO, 2012).

Os aditivos alimentares são utilizados na aquicultura como métodos alternativos aos antibióticos, para melhorar o ganho de peso e controle de surtos de doenças (CAVALHEIRO et al., 2014; RODRIGUES; MEURER; BOSCOLO, 2015). Os aditivos podem ser utilizados na nutrição animal e classificados de acordo com suas funções e propriedades (Quadro 1) podendo ser incluídos em uma ou mais categorias (CAVALHEIRO et al., 2014; RODRIGUES; MEURER; BOSCOLO, 2015).

Os aditivos utilizados na nutrição animal mais estudados atualmente incluem: os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas, extratos vegetais, os alimentos funcionais e fitoterápicos. Estes são utilizados como promotores de crescimento, que podem auxiliar no sistema imune dos peixes, melhorar o desempenho e bem-estar (RODRIGUES; MEURE; BOSCOLO, 2015).

Quadro1: Funções e propriedades de microingredientes utilizados em dietas de animais.

<b>Tipo</b>	<b>Característica</b>	<b>Função</b>
Tecnológicos	Quaisquer substâncias adicionadas ao produto destinado à alimentação animal com a finalidade de melhorar sua consistência, conservação etc.	Adsorvente, aglomerante, antiaglomerante, antioxidante, antiuementante, conservante, emulsificante, estabilizante, espessantes, gelificante, regulador da acidez e umidificante
Sensoriais	Substâncias adicionadas ao produto para melhorar ou modificar suas propriedades organolépticas ou as características visuais dos produtos	Corante, pigmentar, aromatizante, palatabilizante
Nutricionais	Substâncias utilizadas para manter ou melhorar as propriedades nutricionais do produto	Vitaminas, provitaminas e substâncias quimicamente definidas de efeitos similares, oligoelementos ou compostos de oligoelementos, aminoácidos, seus sais e análogos, ureia e seus derivados
Zootécnicos	Substâncias utilizadas para influir positivamente na melhora do desempenho dos animais	Digestivos, equilibradores de biota, melhoradores de desempenho
Anticoccidianos	Substâncias utilizadas na avicultura a fim de impedir a ação dos protozoários da espécie <i>Eimeria</i> em nível intestinal de aves, evitando, assim, a ocorrência de coccidiose	

Fonte: Adaptado de Cavalheiro et al. (2014).

### 1.3.1 Probióticos

O termo probiótico tem origem de palavras gregas que significa ‘pro’ e ‘bios’, ou seja, favor da vida (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999). Fuller (1989) definiu probiótico como: microrganismo vivo utilizado na alimentação que afeta benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de microrganismos da flora intestinal. Contudo, outras definições foram publicadas ao longo dos anos. A definição mais recente utilizada e aceita internacionalmente é: microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO; OMS, 2006; MORELLI; CAPURSO, 2012; SAAD, 2006). No entanto, para aquicultura essa definição não é suficiente, pois os animais aquáticos estão em constantes interações com os microrganismos presentes no ambiente (LOH, 2017; MOURINO, 2010).

Dessa maneira, para aquicultura, Gatesoupe (1999) definiu probiótico como: células microbianas vivas que são administradas de forma a entrar no trato gastrointestinal e se manter vivas, com o objetivo de melhorar a saúde. Outra definição é a proposta por Mouriño et al. (2012) que descreve como: microrganismos vivos que, adicionados ao cultivo de tal maneira que entrem no trato digestivo dos animais, mantendo-se vivos, atuam benéficamente no animal

de interesse, melhorando a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas no trato digestivo.

Em virtude da grande relevância dos probióticos para aquicultura muitos trabalhos vêm sendo publicados ao longo dos anos com intuito de testar e obter melhorias na performance zootécnica e resistência a doenças. Neste sentido Tachibana et al. (2021) avaliou os efeitos de *Bacillus subtilis* ( $1,6 \times 10^{10}$  UFC / g) e *Bacillus licheniformis* ( $1,6 \times 10^{10}$  UFC / g) para a tilápia do Nilo e demonstrou que a concentração de 0,04% e 0,08% na dieta apresentou melhor desempenho de crescimento e modulou a microbiota intestinal, reduzindo a presença de potenciais espécies de patógenos. Assim como, Cornélio et al. (2013) demonstraram que a suplementação dietética com probiótico *Lactobacillus plantarum* na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> em conjunto com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* adicionados na água melhoram o desempenho zootécnico e a resistência de alevinos de *O. niloticus* à infecção por *Aeromonas hydrophila*.

#### 1.3.1.2 Mecanismos de ação dos probióticos

Diferentes modos de ação podem ser identificados, utilizados, empregando-se os probióticos, os aquais irão variar em função do: microrganismo escolhido, se a espécie é autóctone ou alóctone; dos compostos por eles produzidos; bem como a interação probiótico, hospedeiro e ambiente de cultivo. No entanto, devido as limitações tecnológicas utilizadas em pesquisas com animais aquáticos é difícil avaliar esses mecanismos e assim, acaba-se por restringir os modos de ação a suposições (MOURIÑO, 2010). Entre os modos de ação probióticas fortemente hipotetizados estão: competição (exclusão e/ou nutrientes), produção de enzimas digestivas e melhora do sistema imunológico (MOURIÑO, 2010; JESUS et al., 2016; GATESOUBE, 1999).

A competição entre microrganismos pode acontecer por exclusão e competição de nutrientes e espaço (sítio de adesão na parede do trato digestivo) (MOURINO, 2010). De acordo com Ribeiro, Costa, Logado (2008) a exclusão competitiva é a incapacidade de uma população de microrganismos em sua maioria patogênicos, de se estabelecerem no intestino animal, devido a presença de outras populações desejáveis.

Sendo assim, após a suplementação dietética de probiótico, este alimento agora rico em microrganismos benéficos, serão ingeridos pelos animais e como consequência os probióticos poderão encontrar um meio favorável, onde se se multiplicarão e colonizarão o trato gastrintestinal, de modo a se estabelecerem sobre os demais microrganismos presentes (PEREIRA et al., 2017; RIBEIRO; LEANDRO; LOGATO, 2008). Ademais, com o

estabelecimento da população bacteriana benéfica poderá ocorrer um equilíbrio microbiano que possibilitará a redução do pH e conseqüentemente redução de bactérias enteropatogênicas. Portanto, os autóctones e/ou alóctones probióticos podem impedir a colonização de bactérias patogênicas competindo com elas por nutrientes ou espaço da mucosa (LOH, 2017).

Outro modo de ação dos probióticos é como fornecedores de nutrientes, melhoradores de digestibilidade e produtores de enzimas digestivas auxiliares. Como já é de conhecimento da comunidade científica, a microbiota intestinal possui um papel importante na nutrição dos animais, pois influencia diretamente nesse processo, já que, são responsáveis pela fermentação e pré-degradação de inúmeras moléculas. Algumas das quais o hospedeiro é incapaz de degradar e absorver o nutriente, sem a ação dos microrganismos, como por exemplo a celulose (MOURINO, 2010). Sendo assim, o aumento de ganho de peso e/ou aumento de digestibilidade das dietas utilizadas são alguns dos efeitos benéficos esperados (BURR et al., 2008; MOURINO, 2010).

Uma microflora rica em probiótico pode contribuir com alguns fatores, à saber: produção de vitaminas do complexo B (ácido fólico), redução do pH do trato por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta, regulação dos movimentos peristálticos, absorção de minerais como por exemplo o cálcio e a síntese de colesterol (PEREIRA et al., 2016).

Algumas bactérias consideradas probióticas, como: *Agrobacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Clostridium* sp., *Microbaacterium* sp., *Pseudomonas* sp e *Staphylococcus* sp. podem contribuir para a nutrição do hospedeiro, principalmente no fornecimento de ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas para células hospedeiras (LOH, 2017). As bactérias do gênero *Bacillus* por exemplo, possui importante papel na microbiota, pois são produtoras de enzimas como amilases e proteases (RIBEIRO; COSTA; LAGODO, 2008). Tais fatos foram evidenciados por Afrilasari; Widanarni; Meryandini (2016) ao suplementarem o *Clarias* sp. com o probiótico *Bacillus megaterium* (PTB 1.4) na concentração a  $10^{10}$  UFC / g na ração, onde observaram aumento na atividade das enzimas digestivas e no crescimento.

As enzimas digestivas produzidas pelos probióticos são importantes para a dieta dos animais, pois contribuem para a digestão dos nutrientes contidos na ração, conseqüentemente aumento de digestibilidade e eficiência alimentar (AFRILASARI; WIDANARNI; MERYANDINI, 2016). No entanto, apesar dos vários trabalhos envolvendo os probióticos na atividade do trato digestivo ainda é difícil atribuir conceitos exatos, pois existe uma grande complexidade e ecologia variável dos tratamentos digestivos para os diferentes peixes (LOH, 2017).

Outro papel importante dos probióticos é a estimulação do sistema imune, pois de acordo com Nayak (2010) estes podem modular vários parâmetros hematológicos,

como: interagir com células fagocíticas mononucleares (monócitos, macrófagos), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células natural *killer* (NK) para aumentar as respostas imunes inatas. Nesse sentido, Jatobá et al. (2008) relataram que a suplementação de *Lactobacillus plantarum* para *O. niloticus* melhorou a respostas inespecífica do sistema imune. Condizente com os achados de Aly et al. (2008), que observam melhora no estado imunológico e de saúde em *O. niloticus* após suplementação de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus acidophilus*.

### 1.3.1.3 Principais probióticos na piscicultura

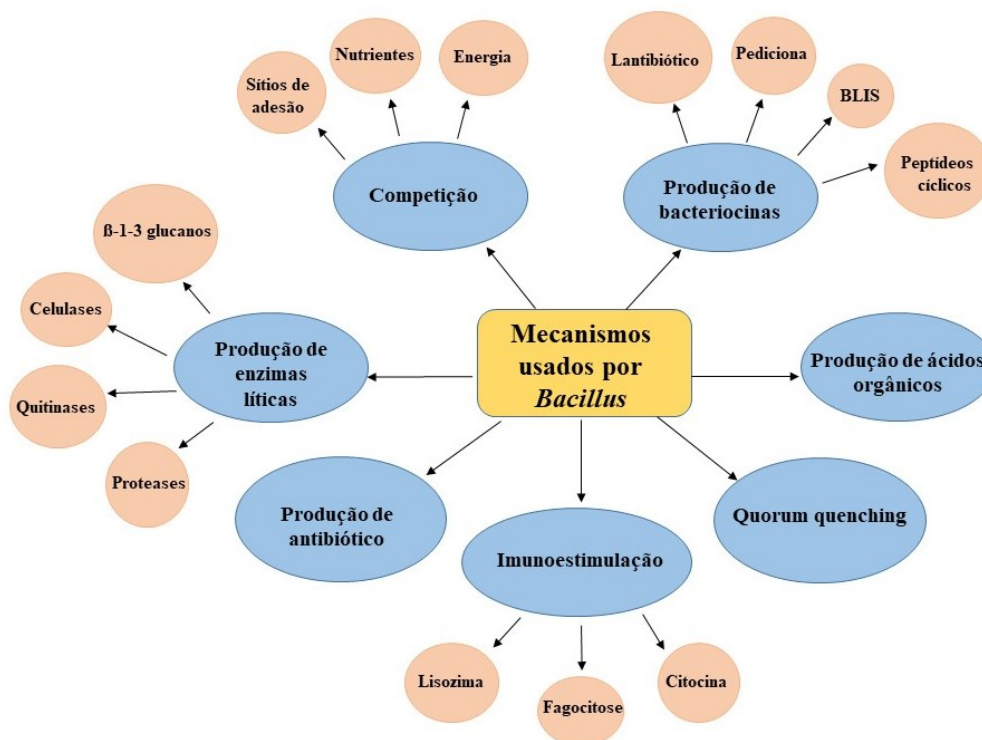
Para aquicultura gêneros de bactérias probióticas comumente utilizados são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Saccharomyces* (CARNEVALI; MARADONNA; GIOACCHINI, 2017; MERRIFIELD; CARNEVALI, 2014). Para piscicultura, bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus* sp., bactérias esporuladas como *Bacillus* sp., bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. e *Aeromonas* sp. são utilizadas como probióticos. No entanto, algumas bactérias como *Pseudomonas* sp., *Vibrios* spp. *Aeromonas* sp e *Bacillus* sp. podem ser patogênicas para algumas espécies de peixes e consequentemente causar mortalidades no cultivo. Portanto, recomenda-se a caracterização fenotípica e molecular da cepa, a fim de, se determinar a existência de patogenicidade do microrganismo para espécie de peixe alvo antes da sua utilização como probiótico (YAMASHITA, 2015).

Diante dos gêneros citados previamente como probióticos para peixes é importante destacar as bactérias ácidos-láticas e os bacilos como: *L. plantarum*, *B. subtilis*, *B. licheniformes*, *B. circulans*. Estes possuem capacidade de produção de compostos antimicrobianos, estimulação do sistema imune e capacidade de secretar enzimas digestivas (PEREIRA et al., 2016). Ademais, as bactérias do gênero *Bacillus* tem a capacidade de esporularem que compreende uma vantagem dupla em termos de sobrevivência (tolerância ao calor e maior vida útil) em muitos ambientes em relação a outros probióticos, tornando-se fáceis de serem incorporadas nos processos industriais de fabricação de ração (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019).

As bactérias do gênero *Bacillus*, também sintetizam antibióticos / metabólitos que são antagonicos contra patógenos, como também possuem habilidades imunoestimulatórias (KUEBUTORNYE et al., 2020; AL-AJLANI; HASNAIN, 2014). Adicionalmente, segundo Kuebutarnye et al. (2020), muitos pesquisadores afirmam que o *Bacillus* poderia ser usado para mitigar doenças na indústria piscícola. Os possíveis mecanismos do probiótico *Bacillus* na

defesa contra patógenos na aquicultura são apresentados Figura 1 (KUEBUTARNYE et al., 2020).

Figura 1: Mecanismos usados pelo *Bacillus* contra patógenos na aquicultura.



Fonte: Adaptado de Kuebutarnye et al. (2020).

### 1.3.2 Ácidos orgânicos e sais

Ácidos orgânicos são ácidos graxos de cadeia curta, produtos naturais provenientes de fermentação de microrganismos ou sintetizados quimicamente (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013) e são assim denominados por apresentarem átomos de carbono e hidrogênio. O grupo mais abundante é o dos ácidos carboxílicos, ou seja, os que apresentam o grupamento funcional carboxila (COOH). Para se obter um sal de ácido orgânico é necessário quelá-lo a algum mineral, e dessa forma a molécula obtida é muitas vezes mais estável e de fácil manuseio (NG; KOH, 2017; PEREIRA, 2019).

Os ácidos orgânicos e seus sais são considerados aditivos alimentares muito promissores para uso na produção de animais aquáticos de cultivo como métodos alternativos a substâncias antibióticas que vise inibir patógenos e promover crescimento (SILVA et al., 2013). Portanto, nos últimos anos estudos com ácidos orgânicos para animais aquáticos têm se intensificado, exatamente pelas mudanças nos controles regulatórios globais sobre o uso de antibióticos como promotores de crescimento (NG; KOH, 2017) e pela maior facilidade de incorporação destes pelas indústrias de rações em comparação ao probióticos.

Dentre os efeitos benéficos apontado ao uso de dietas suplementadas com ácidos orgânicos, cita-se: melhorias na digestibilidade dos alimentos e consequentemente na performance zootécnica (SCAPINELLO et al., 2001). Adicionalmente, estas substâncias podem atuar na inibição do crescimento de microrganismos, principalmente as bactérias Gram-negativas, ter efeito no metabolismo e influenciam na produção de enzimas digestivas, melhorando a absorção de minerais no intestino (SANTOS-JUNIOR et al., 2016).

Atualmente, o uso de ácidos orgânicos na dieta animal possui resultados consistentes tanto para animais terrestres como para aves e suínos, quanto para animais aquáticos. Logo, para mamíferos como suínos o uso de ácidos orgânicos e inorgânicos é muito utilizado em dietas nas fases de pré e pós desmame, pois auxiliam a digestão proteica e controlam a proliferação bacteriana intestinal (LIM et al., 2015; SILVA, 2014). Na aquicultura o uso de ácidos orgânicos ou seus sais têm promovido aumento expressivo de pesquisa com resultados satisfatórios e a geração de produtos comerciais à base destas substâncias (SILVA et al., 2017; LIM et al., 2015). Diante disso, Silva et al. (2008) avaliaram o efeito de diferentes ácidos orgânicos, à saber: acético, láctico, propiônico e ascórbico (*blend*) nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; e 0,10% em dieta de alevinos de tilápia-do-nylo e constataram influência positiva da suplementação no ganho de peso e indicaram que o nível mais adequado na dieta é de 0,043%.

#### 1.3.1.2 *Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos*

Os ácidos orgânicos possuem fórmula estrutural geral R-COOH, considerado composto orgânico carboxílico, cujo a acidez é determinada pelo seu grupo carboxila (-COOH). São considerados, portanto, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos voláteis e ácidos fracos, pois se dissociam parcialmente na água para formar íons (LIM et al., 2015; NG; KOH, 2016). Os ácidos orgânicos possuem alguns mecanismos de ação dos quais os mais conhecidos são: os efeitos na dieta, metabolismo e efeito antimicrobiano no trato intestinal.

Os efeitos na dieta estão relacionados a capacidade dos ácidos orgânicos atuarem como agentes de conservação, reduzindo pH do alimento, inibindo o crescimento microbiano e diminuindo o crescimento de organismos patogênicos (LÜCKSTÄDT, 2007; SILVA, 2014; NG; KOH, 2016). No trato gastrointestinal, reduzem o nível de pH no estômago, mas especialmente no intestino delgado, através do fornecimento de íons de hidrogênio ( $H^+$ ), dessa maneira, inibem o crescimento de bactérias Gram-negativas através da dissociação dos ácidos e da produção de ânions no interior de células bacterianas (LÜCKSTÄDT, 2007; SILVA,



2014; ADDAM, 2018; LIM et al., 2015). A adição de ácidos orgânicos na dieta também pode resultar em melhor digestibilidade de nutrientes (NG; KOB, 2016).

De acordo com Silva (2014) os ácidos orgânicos podem ser utilizados para modificar o pH das dietas (Quadro 2), levando-os a valores desejáveis e conseqüentemente melhorar o aproveitamento dos nutrientes. No entanto, poucos estudos são encontrados na literatura avaliando efeito de diferentes valores de pH em dietas para animais aquáticos (SILVA, 2014). Com o intuito de investigar esse efeito, Addam et al. (2019) observaram que a suplementação de ácidos orgânicos e seus sais (formato de amônio, ácido fórmico, ácidos graxos vegetais, ácido propiônico e ácido acético) para tilápia-do-nylo reduziu o pH da dieta experimental em relação ao grupo controle (sem adição de ácido orgânico). Além de promover melhorias na sobrevivência em relação ao grupo controle, demonstrou que a redução do pH acarretou no incremento do aproveitamento dos nutrientes da dieta.

No metabolismo, um dos principais mecanismos dos ácidos orgânicos é sobre as várias rotas metabólicas que culminam na produção de adenosina trifosfato (ATP), através do ciclo de Krebs ou também chamado de ciclo do ácido cítrico (SILVA, 2014). Ademais, estas substâncias podem também afetar a ação de enzimas digestivas, como a pepsina, através da redução do pH da dieta (LÜCKTADTS, 2008). Tal fato, é explicado durante os períodos de alto consumo de ração, quando os animais são jovens ou quando os alimentos são ricos em proteína, as concentrações de ácido clorídrico no estômago são reduzidas, esta redução impacta negativamente a ativação de pepsina e secreção de enzimas pancreáticas prejudicando a digestão. Portanto, o fornecimento de ácido orgânico na dieta pode resolver este problema e auxiliar na digestão do alimento (LIM et al., 2015).

Adicionalmente, já foi comprovado de forma científica a eficácia antimicrobiana dos ácidos orgânicos, principalmente contra bactérias Gram-negativas (KNARREBORG et al., 2002). Estes atuam promovendo efeito bacteriostático e/ou bactericida, através das formas ionizadas que permeiam passivamente a membrana dos microrganismos e liberaram prótons no citoplasma ( $H^+$ ). Esse excesso de ânions de hidrogênio leva a redução do pH citoplasmático, fazendo com que as células microbianas tenham gastos exacerbados de ATP para retirar os prótons, o que resulta em uma depleção energética e conseqüentemente a morte microbiana (Quadro 2) (SILVA, 2014; SILVA et al., 2017; LÜCKTADTS, 2008).

Contudo, a depleção de ATP não é o único mecanismo pelo qual os ácidos orgânicos inibem o crescimento celular e induzem a morte de bactérias patogênicas, o acúmulo de ânions no interior do citoplasma pode inibir a síntese de macromoléculas, como por exemplo: ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, carboidratos, atividade enzimática e transportes de nutrientes;

resultando, portanto, em morte celular (NG; KOB, 2016). Além disso, os ácidos orgânicos podem também influenciar o sistema gastrointestinal

dos animais, atuando na motilidade intestinal, esvaziamento gástrico e na absorção de minerais e de água (CAVALHEIRO et al., 2014; RODRIGUES; MEURER; BOSCOLO, 2015).

No quadro 2 é possível encontrar explicação de forma resumida dos principais mecanismos anteriormente descritos para os ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal.

Quadro 2: Mecanismos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal.

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

Fonte: Adaptado de Lücktädt. (2008).  
H<sup>+</sup> - Forma não ionizada. Ânion – Forma ionizada.

### 1.3.1.3 Principais ácidos e ou sais orgânicos

Recentemente, os estudos de ácidos orgânicos têm se intensificado para uso em dietas para animais aquáticos, fim de avaliar os efeitos no desempenho de crescimento, utilização de nutrientes e resistências a doenças. Os efeitos desta suplementação já foram investigados para várias espécies de peixes, entre estas a tilápia, carpa, salmão e truta arco-íris, as quais são de maior importância comercial para aquicultura (NG; KOH. 2016).

Dessa maneira, os ácidos orgânicos e seus sais mais utilizados são: o ácido fórmico, propiônico, láctico, butírico, cítrico, propionato de cálcio, sorbato de potássio, e benzoato de sódio (SILVA. 2014; LIM et al., 2015). Estes apresentam efeitos benéficos na dieta, no trato intestinal e metabolismo dos animais cultivados (NEVES, 2018). Neste sentido, Silva et al. (2008) observaram que a dieta suplementada com ácidos orgânicos (acético, láctico, propiônico e ascórbico) sobre o desempenho de alevinos de tilápia-do-nilo influenciou positivamente no ganho de peso dos animais.

Entre os ácidos orgânicos citados é válido mencionar o ácido benzoico, por possuir benefícios na dieta e potencial função antimicrobiana. É considerado o mais importante ácido carboxílico aromático para suplementação dietética (GHELER et al., 2009). Tem fórmula  $C_7H_6O_2$  composto de um anel aromático de cadeia curta, sendo mais simples da sua categoria. Pode ser encontrado na natureza na forma pura ou em conjunto com outras substâncias, tais com: extrato de amoras silvestres, extrato de própolis, alguns tipos de cogumelos, tomates frescos, outras frutas e produtos fermentados (OLIVEIRA; REIS, 2017).

Na literatura há escassez de estudos sobre o ácido benzoico como aditivo alimentar para peixes. Contudo, a suplementação dietética de ácido benzoico para suínos tem demonstrado melhorias no crescimento, desempenho alimentar, altura e profundidade dos vilos (GHELER et al., 2009). Assim como, também é capaz de modificar a microbiota intestinal e atuar no controle de patógenos entéricos (ALVARADO et al., 2013).

Um estudo *in vitro*, Knarreeborg (2002) avaliou os efeitos de vários ácidos orgânicos na microbiota intestinal de leitões e demonstrou que o ácido benzoico possui ação antibacteriana, o que forneceu base para sua aplicação na criação animal (DIAO et al., 2016). Da mesma forma, Torrallardona; Badiola; Broz (2007) testaram o ácido benzoico como suplemento para leitões desmamados e demonstraram que a adição de 0,5% na dieta melhorou o desempenho zootécnico dos mesmos.

#### 1.4 INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO CONJUNTA DE PROBIÓTICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

O uso em conjunto de probióticos e ácidos orgânicos pode promover efeito benéfico no trato intestinal, através do efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos em reduzir bactérias prejudiciais, contribuir para a proliferação do probiótico e outras bactérias tolerantes ao ácido orgânico no trato gastrointestinal. (BROOM, 2014) No entanto, é necessário determinar concentrações do ácido orgânico ideal que não inibiram o crescimento do probiótico. Portanto, o uso em conjunto destes podem ter efeitos sinérgicos benéficos na saúde e desempenho dos animais aquícolas pelos efeitos benéficos ao organismo que os dois aditivos possuem.

São poucos os estudos sobre o uso em combinado do ácido orgânico e probiótico, principalmente com o uso do gênero *Bacillus* e ácido benzoico. Estudos levando em consideração a suplementação em conjunto de ácido orgânico e probiótico demonstram efeitos benéficos destes na performance zootécnica e saúde, digestibilidade de nutrientes e sistema imunológico mencionados a seguir.

Dentre a ínfimo de trabalhos observados na literatura está o de, Ramírez et al. (2017) que avaliaram a suplementação conjunta do probiótico *Lactobacillus plantarum* ( $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) e do sal orgânico butirato de sódio (2%) para *Litopenaeus vannamei* e demonstraram que o uso em conjunto aumentou a resistência de *L. vannamei* após desafio experimental com *Vibrio alginolyticus*, porém não alterou os parâmetros zootécnicos e imunológicos do camarão marinho.

Como os estudos avaliando o uso em conjunto de probiótico e ácido orgânico são escassos para aquicultura, faz-se necessárias contribuições de estudos com outros animais, como os mamíferos e aves. Diante disso, em estudo para aves (pintos de corte), Wolfernden et al. (2007) observaram que o uso de probiótico *Lactobacillus* sp. em conjunto com uma mistura de ácidos orgânicos contra infecção com *Salmonella enteritidis* resultou em menor concentração do patógeno em relação aos grupos individuais, indicando efeito sinérgico do uso combinado.

Já Bozkurt et al. (2009) avaliaram a suplementação conjunta de ácido orgânico, probiótico e prebiótico para frango de corte e observaram significativo aumento do ganho de peso corporal e com taxas de conversão alimentar ligeiramente melhoradas em relação ao controle (grupo não suplementado).

O uso de ácidos orgânicos e probióticos mostram efeitos positivos na suplementação animal, cujo, existem relatos que ácidos orgânicos e probióticos melhoram o crescimento e a utilização da ração sem afetar negativamente o desempenho do crescimento (RODJAN et al., 2018). Tal fato foi evidenciado por Rodjan et al. (2017) demonstrando que a suplementação dietética em conjunto de ácidos orgânicos (ácido fumárico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiônico e ácido cítrico) e probiótico contendo *Bacillus* para pintinhos aumenta a capacidade de digestão de fibras brutas, da altura das vilosidades e diminui a concentração de *Escherichia coli* intestinal, sem prejudicar o desempenho de crescimento. Assim como, Agboola et al. (2015) que avaliaram os efeitos de ácidos orgânicos e probiótico (*Lactobacillus sporogenes* e *Saccharomyces cerevisiae*) e demonstraram que o uso em conjunto pode melhorar o crescimento, a morfologia intestinal, até mesmo mais do que o uso de antibióticos, com maior efeito positivo na fase inicial de frango de corte.

O uso combinado de probiótico e ácido orgânico pode melhorar o sistema imune atuando assim em sinergismo, cujo, ácido orgânico ajuda na colonização de bactérias benéficas que desempenham seu papel no sistema imune dos animais (BROOM, 2014). Em estudo para aves, Rodríguez-Lecompte et al. (2012) testaram a suplementação combinada de probiótico

(*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae*) e ácidos orgânicos (ácido sórbico e cítrico) em dieta para pintinhos e demonstraram que a suplementação teve efeito na resposta imune, pois foi capaz de alterar TLR-2 (receptores Toll-like, proteínas de conhecimento de patógenos) e citocina.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação dietética do mix probiótico de *Bacillus* spp. em conjunto com o ácido benzoico sob a saúde e desempenho de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

### 1.5.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar os efeitos da suplementação dietética do mix probiótico *Bacillus* spp. em conjunto com ácido orgânico benzoico sob parâmetros zootécnicos e hematoimunológicos.
- b) Avaliar a sobrevivência de *O. niloticus* desafiada com *Streptococcus agalactiae* após o período de suplementação dietética do mix probiótico *Bacillus* spp. em conjunto com ácido orgânico benzoico.

## 1.6 ESTRUTURA DO TRABALHO

Esta dissertação é composta por um artigo científico, que será submetido ao periódico “Aquaculture” e foi formatado segundo as normas.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

**Mix probiótico de *Bacillus* spp. e ácido orgânico benzoico como promotor de crescimento e resistência à *Streptococcus agalactiae* em tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus***

Santos, G.G.<sup>1</sup>; Libanori, M.C.M.<sup>1</sup>; Pereira, S.A.<sup>1</sup>; Ferrarezi, J.V.S.<sup>1</sup>; Ferreira, M. B. <sup>1</sup>; Soligo, T.A.<sup>2</sup>; Yamashita, E.<sup>2</sup>; Martins, M.L.<sup>1</sup>; Mouriño, J.L.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AQUOS-Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

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

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

Autor correspondente: Gracienne Gomes dos Santos (AQUOS – Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de aquicultura, UFSC, SC, Brasil). E-mail: [gracienne.goms@htomail.com](mailto:gracienne.goms@htomail.com)

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do mix probiótico (PureGro™) composto de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* na concentração de  $10^{11}$  (UFC g<sup>-1</sup>) e do ácido benzoico (VevoVital®), sob o desempenho zootécnico e parâmetros hematoimunológicos de juvenis de tilápia-do-nylo, além de avaliar a sobrevivência e parâmetros imunológicos, após infecção com *Streptococcus agalactiae* via gavagem. Um total de 320 peixes foram distribuídos em quatro grupos com quatro repetições (20 peixes por unidade experimental) sendo alimentados durante 54 dias, com os seguintes grupos experimentais: controle, ração suplementada com ácido benzoico a 0,1% (AB<sub>0,1%</sub>), ração suplementada com mix probiótico *Bacillus* spp. (B), e ração suplementada com mix probiótico *Bacillus* spp. em conjunto com o ácido benzoico 0,1% (B+AB<sub>0,1%</sub>). Os peixes alimentados com ácido benzoico 0,1% apresentaram melhores resultados para ganho de peso ( $48,33 \pm 5,23$  g), biomassa final ( $1005,99 \pm 85,10$  g), taxa de crescimento específico ( $4.14 \pm 0.08$ ) e sobrevivência após desafio experimental em relação ao grupo controle. O número de trombócitos foi influenciado positivamente em todos os tratamentos AB<sub>0,1%</sub> ( $1,98 \pm 0,96 \mu\text{L}^{-1}$ ), (B) ( $2,86 \pm 1,12 \mu\text{L}^{-1}$ ), (B+AB<sub>0,1%</sub>) ( $3,17 \pm 2,03 \mu\text{L}^{-1}$ ) em relação ao grupo controle ( $0,51 \pm 0,28 \mu\text{L}^{-1}$ ). Atividade aglutinante foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo suplementado com mix probiótico *Bacillus* na pós-infecção em relação aos outros tratamentos. Enfatiza-se que a suplementação de ácido benzoico 0,1% proporcionou melhor desempenho zootécnico e sobrevivência ao desafio com *S. agalactiae* para tilápia-do-nylo.

**Palavras chaves:** Aquicultura. Piscicultura. Tilapicultura. Aditivo alimentar. Saúde.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Diante do cenário mundial de crescimento aquícola a piscicultura, destaca-se como potencial produtora de alimento devido à alta fonte de proteínas e micronutrientes essencial para saúde humana (Hindu et al., 2019). No Brasil, a piscicultura em águas continentais é representada principalmente pela tilapicultura, pois é considerado um forte segmento na cadeia aquícola de produção de alimento (Albuquerque et al., 2013).

Em razão do aumento populacional mundial a demanda de proteína animal, encontra-se em crescimento, e tal fato não seria diferente para o consumo de peixes. Sendo assim, para atender a crescente procura por proteína proveniente de pescado, os produtores têm empregado os sistemas intensivos de produção (Silva et al., 2008). Ao longo dos anos, com aumento da produção na piscicultura brasileira, tem-se observado intensificação de problemas relacionados à sanidade, o que dificulta a vida dos piscicultores brasileiros (Leira et al., 2017a).

Um dos grandes problemas na produção aquícola são as doenças de cunho viral, fúngico e bacteriano. Os animais aquáticos são afetados por estes diferentes agentes etiológicos em virtude da debilitação do sistema imunológico ocasionado por condições estressantes, má alimentação e fatores abióticos, que podem resultar em grandes mortalidades nos cultivos (Albuquerque et al., 2015; Hindu et al., 2019).

Nos últimos anos bactérias patogênicas como as Gram-positivas, em destaque a *Streptococcus agalactiae* foi relatada como causadora de mortalidade em tilápias, levando assim perdas econômicas consideráveis (Yin et al., 2018). A *Streptococcus* do grupo B é uma bactéria patogênica importante para seres humanos, bovinos e nas últimas décadas tem se destacado como patógeno emergente na piscicultura (Leira et al., 2017a). Para minimizar os problemas relacionados a sanidade, várias pesquisas vêm sendo conduzidas nos últimos anos, com o intuito de melhorar a performance zootécnica e resistência a enfermidades dos animais aquáticos. Dentre estes métodos alternativos pode se destacar o uso de probióticos e ácidos orgânicos (Albuquerque et al., 2013).

Os probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos capazes de colonizar, estabelecer-se e multiplicar-se no intestino do hospedeiro, além de promover o equilíbrio da microbiota (Mello et al., 2013). Os microrganismos gram-positivos mais comumente utilizados na indústria como probióticos são: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, espécies de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* e *Weissella* (Buruiana et al., 2014).

Na aquicultura o gênero *Bacillus* é um dos microrganismos probiótico mais utilizados como aditivo alimentar em decorrência da sua capacidade de: resistir a altas temperaturas e



pressões; promover benefícios nos índices produtivos como sobrevivência, imunidade, resistência a doenças, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica (Mello et al., 2013). Tachibana et al. (2021) avaliou os efeitos de *Bacillus subtilis* ( $1,6 \times 10^{10}$  UFC / g) e *Bacillus licheniformis* ( $1,6 \times 10^{10}$  UFC / g) para a tilápia do Nilo e demonstrou que a concentração de 0,04% e 0,08% na dieta apresentou melhor desempenho de crescimento e modulou a microbiota intestinal, reduzindo a presença de potenciais espécies de patógenos.

Além do uso de probióticos na produção animal outras substâncias vêm ganhando destaque como os ácidos orgânicos e seus sais por atuarem na inibição de patógenos e promoverem melhor crescimento animal (Silva et al., 2017). Os ácidos orgânicos possuem efeitos benéficos quando adicionado na dieta de animais, pois proporciona melhorias na digestibilidade dos alimentos e conseqüentemente na performance zootécnica (Scapinello et al., 2001). Adicionalmente, estas substâncias podem atuar na inibição do crescimento de microrganismos, principalmente as bactérias Gram-negativas, ter efeito no metabolismo e influenciam na produção de enzimas digestivas, melhorando a absorção de minerais no intestino (Santos-Junior et al., 2016). Neste sentido, Silva et al., (2008) observaram que a dieta suplementada com ácidos orgânicos (acético, láctico, propiônico e ascórbico) sobre o desempenho de alevinos de tilápia do Nilo influenciou positivamente no ganho de peso.

Entre os ácidos orgânicos com potenciais de aplicabilidade na piscicultura, destaca-se o ácido benzoico como o mais importante ácido carboxílico aromático (Gheler et al., 2009). O ácido benzoico tem fórmula ( $C_7H_6O_2$ ) simples de cadeia curta, pode ser encontrado na natureza na forma pura ou em conjunto com outras substâncias, tais com: extrato de amoras silvestres, extrato de própolis, alguns tipos de cogumelos, tomates frescos, outras frutas e produtos fermentados (Oliveira and Reis, 2017). Na literatura há escassez de estudos sobre o ácido benzoico como aditivo alimentar para peixes. Contudo, a suplementação dietética de ácido benzoico para suínos tem demonstrado melhorias no crescimento, desempenho alimentar, altura e profundidade dos vilos (Gheler et al., 2009). Assim como também é capaz de modificar a microbiota intestinal e atuar no controle de patógenos entéricos (Alvarado et al., 2013).

Para aquicultura o uso de probióticos em conjunto com ácidos orgânicos e/ou seus sais tem grande potencial, pois o uso conjunto destes podem ter efeitos sinérgicos benéficos na saúde e desempenho dos animais, por inibirem o crescimento de bactérias patogênicas e melhorarem a saúde gastrointestinal (Silva et al., 2017). Neste contexto, o objetivo foi avaliar a influência da suplementação dietética do mix probiótico *Bacillus sp.* em conjunto com ácido orgânico benzoico para juvenis de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob o desempenho

zootécnico, parâmetros hematoimunológicos e resistência a infecção experimental via gavagem com *Streptococcus agalactiae* soro tipo B.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS) do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todos os procedimentos aplicados aos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA / UFSC 2793230320).

### 2.2.1 Material biológico

Os peixes (tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, linhagem GIFT, provenientes de uma população monosexo masculina) foram cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). O mix probiótico comercial (PureGro™) contendo *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*  $10^{11}$  (UFC g<sup>-1</sup>), e o ácido benzoico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) (VevoVital®) foram doados pela empresa DSM®. A *S. agalactiae* S13 sorotipo B foi isolado de um surto de mortalidade em tilapicultura no Paraná por Facimoto et al. (2017) e concedida ao AQUOS/UFSC. A sequência completa genoma está disponível em bancos de dados públicos DDBJ / EMBL / GenBank em número de acesso CP018623 e número do BioProject PRJNA356737.

### 2.2.2 Preparo das dietas Experimentais

A dieta experimental base foi formulada, a fim de atender às exigências nutricionais da espécie de acordo com o NRC (2011) (Tabela 1). A composição centesimal da dieta foi realizada no Laboratório de Nutrição da UFSC (LabNutri / UFSC), seguindo os procedimentos padrão detalhados pela AOAC (AOAC, 1997) (Tabela 1). Sendo assim, preparou-se quatro distintas dietas à saber: sem suplementação (controle), suplementada apenas com ácido benzoico 0,1% (AB<sub>0,1%</sub>), suplementada apenas com mix probiótico *Bacillus* spp. (B), e suplementada conjuntamente com mix probiótico *Bacillus* spp. e com ácido benzoico 0,1% (B+AB<sub>0,1%</sub>).

Tabela 1: Formulação e composição centesimal (em matéria seca) da dieta base.

<b>Ingrediente, g kg<sup>-1</sup></b>	<b>Dieta base</b>
Farelo de Soja	500
Vísceras de Frango	100
Quirera de Arroz	218,5
Milho	171
Óleo de soja	7
Cloreto de Colina	2
Premix <sup>1</sup>	1,5
Umidade	87,16
Proteína bruta	350,8
Extrato etéreo	55,9
Matéria Mineral	54,3

<sup>1</sup>Composição Premix DSM Rovimix: Vitamina A 5.333.000 IU kg<sup>-1</sup>; Vitamina D3 1.000.000 IU kg<sup>-1</sup>; Vitamina E 66,7 g kg<sup>-1</sup>; Vitamina K3 3,33 g kg<sup>-1</sup>; Vitamina B1 6,67 g kg<sup>-1</sup>; Vitamina B2 10 g kg<sup>-1</sup>; Vitamina B6 10 g kg<sup>-1</sup>; Vitamina B12 0,013 g kg<sup>-1</sup>; Niancina 53,33 g kg<sup>-1</sup>; Ácido pantotênico 26,67 g kg<sup>-1</sup>; Biotina 0,333 g kg<sup>-1</sup>; Ácido fólico 2,67 g kg<sup>-1</sup>; Vitamina C 100 g kg<sup>-1</sup>; Cobre 3,33 g kg<sup>-1</sup>; Ferro 20 g kg<sup>-1</sup>; Manganês 16,67 g kg<sup>-1</sup>; Iodo 0,67 g kg<sup>-1</sup>; Cobalto 0,033 g kg<sup>-1</sup>; Zinco 26,6 g kg<sup>-1</sup>; Selênio 0,167 g kg<sup>-1</sup>.

Para a realização da ração com o mix probiótico *Bacillus* spp., procedeu-se primeiramente o preparo do inóculo, o qual foi ativado em solução salina estéril-SSE a 0,65% de NaCl (1g: 9mL). No grupo suplementado com apenas ácido benzoico 0,1%, o preparo seguiu a confecção da solução mãe (ácido benzoico a 8%, diluído em 50% de álcool de cereais e 50% em SSE 0,65%). A partir dessa solução, fez-se a diluição em SSE para obter a concentrações de 0,1% de ácido benzoico. Já o grupo suplementado com mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido benzoico 0,1% o inóculo foi composto de 50% mix probiótico *Bacillus* spp., e 50% de ácido benzoico a 0,1%. Posteriormente, a ração foi aspergida com seus respectivos inóculos na proporção de 100 mL Kg<sup>-1</sup> de ração. A mistura foi incubada a 35 °C por 30 min em recipiente hermeticamente fechado. Após, este recipiente foi aberto e seco em estufa bacteriológica com recirculação de ar, a 30 °C por 12 h. A ração do grupo não suplementado (controle) foi aspergida apenas com SSE nas mesmas proporções e condições. Este processo foi realizado semanalmente.

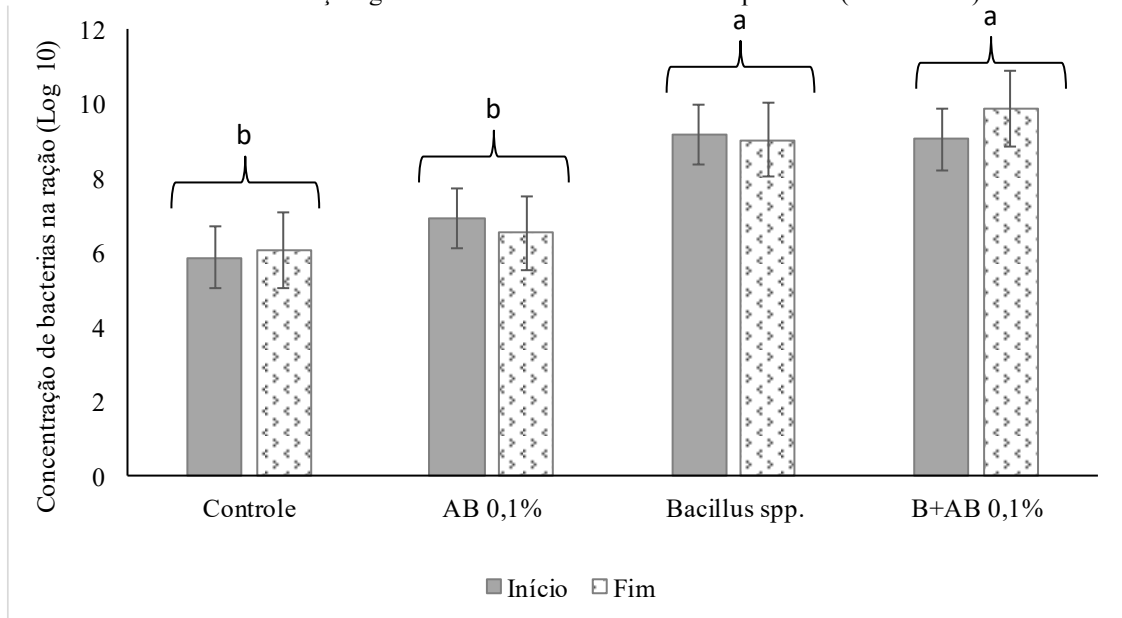
### 2.2.1.1 Contagem microbiológica da ração

Para avaliar a permanência do mix probiótico *Bacillus* spp. na ração dos grupos suplementados foi realizado a contagem de bactérias heterotróficas totais no início e ao final de

cada semana. Para tal, 1 g da ração dos grupos suplementados e controle, foi macerado, acrescido de 9 ml de SSE a 0,65% e diluído serialmente oito vezes no fator 1:10. As concentrações presentes de bactérias heterotróficas totais foram quantificadas semeando as diluições  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  em meio de cultura ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia®) e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 h. As concentrações presentes de microrganismos foram aferidas em unidades formadoras de colônia por grama de ração ( $\text{UFC g}^{-1}$ ).

As concentrações bacterianas iniciais nos grupos suplementados (*Bacillus* spp. em conjunto com ácido benzoico 0,1%) se mantiveram após sete dias da aspersão na concentração de  $1,32 \times 10^9$  e  $4,35 \times 10^9$ , respectivamente, indicando que o método de inoculação do mix probiótico foi eficiente. Dessa forma, não houve diferença significativa entre as concentrações iniciais e após sete dias de inoculação. Entretanto, observou-se diferença significativa entre os grupos que receberam o mix probiótico em relação aos sem suplementação bacteriana (Figura 1).

Figura 1: Contagem microbiológica média da ração ( $\text{Log}_{10}$ ) do grupo não suplementado (controle), suplementado com apenas ácido benzoico 0,1%, suplementado apenas o mix probiótico *Bacillus* spp., ou suplementado com o mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido benzoico 0,1%, no início da inoculação (dia zero) e ao final da semana (7 dias). Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão. \*Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). \*\* Não houve diferença significativa entre os tratamentos os períodos (início e fim).



### 2.2.3 Desenho experimental

Um total de 320 peixes com peso médio inicial de  $5,80 \pm 0,23$  g foram divididos aleatoriamente em 16 tanques de polietileno de 100 L de capacidade, com volume útil de 80 L, com 20 peixes por tanque em quadruplicata para cada grupo experimental. Os peixes foram aclimatados as condições experimentais por 15 dias. Sendo assim, os grupos

experimentais para avaliar o efeito sinérgico do mix probiótico *Bacillus* spp. e ácido benzoico, foram:

- a) Não suplementado (controle);
- b) Peixe alimentado com dieta suplementada ácido benzoico 0,1% (AB<sub>0,1%</sub>);
- c) Peixe alimentado com dieta suplementada com mix probiótico *Bacillus* spp. (B);
- d) Peixe alimentado com dieta suplementada com mix probiótico *Bacillus* spp. e com ácido benzoico 0,1% (B+AB<sub>0,1%</sub>).

Os peixes foram alimentados de acordo com a tabela de alimentação proposto pela empresa EPAGRI (Silva e Marchiori, 2018), que leva em consideração a temperatura e o tamanho dos animais. Para o acompanhamento do crescimento, biometrias quinzenais foram realizadas. Quando excesso de ração era observado, no dia seguinte, uma redução de 10% foi padronizada; quando nenhuma sobra de alimento era observada, mais 10% era adicionado no dia seguinte. O excesso de ração e fezes eram removidos dos tanques duas vezes ao dia por sifonagem. O ensaio teve duração de 54 dias.

Durante todo o período, as unidades experimentais (UE) estavam acopladas a um sistema de recirculação de água do tipo semiaberto com uma vazão de 0,022 L.s<sup>-1</sup>; composto de decantador, filtros mecânicos, biológicos (anaeróbicos e aeróbicos), esterilização por ultravioleta e fotoperíodo controlado de 12 h (Owatari et al., 2018). Os parâmetros de qualidade de água foram medidos diariamente. Oxigênio, alcalinidade, pH, amônia total, amônia tóxica, nitrito e nitrato foram medidos pelo método colorimétrico (Kit Labcon Test®, Brasil). Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos em: temperatura 28,90 ± 2,36°C; oxigênio dissolvido 7,00 ± 1,07 mg L<sup>-1</sup>; alcalinidade 49,08 ± 28,48 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>; pH 6,70 ± 0,34; amônia total 4,25 ± 1,56 mg L<sup>-1</sup>; amônia tóxica 0,02 ± 0,01 mg L<sup>-1</sup>; nitrito 1,93 ± 0,72 mg L<sup>-1</sup>; e nitrato 3,5 ± 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

No final de ensaio de suplementação dietética (54 dias), os peixes foram avaliados, quando: ao desempenho zootécnico; seis animais por UE foram utilizados para as análises hematoimunológicas. Os demais peixes foram mantidos nas UEs para o desafio experimental via gavagem com a *S. agalactiae* (CP018623). Os animais sobreviventes da infecção foram amostrados para coleta de plasma e posterior análises imunológicas.

#### 2.2.4 Índices zootécnicos

Ao final do experimento (54 dias) após 24 h de jejum, todos os peixes de cada unidade experimental foram anestesiados com Eugenol Vetec® (75mg L<sup>-1</sup>), contados e pesados em balança de precisão (0,01 g), para avaliação do ganho de peso (GP), ganho de peso em biomassa

(GB); a taxa de crescimento específico (TCE), a conversão alimentar (CA) e a sobrevivência (S) foram analisados (LAZZARI et al., 2011).

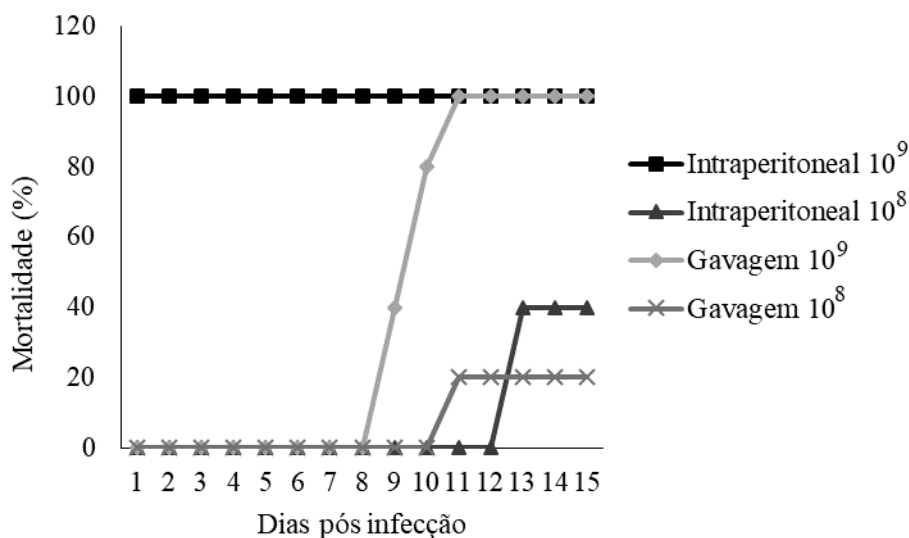
- a) GP = peso médio final – peso médio inicial
- b) GB = biomassa final – biomassa inicial
- c) TCE = [(In peso final – In peso inicial) / tempo] \* 100
- d) CA = dieta consumida / ganho em peso
- e) S = (número de animais final / número de animais inicial) \* 100

### 2.2.5 Exposição a *Streptococcus agalactiae* via gavagem

A dose e a via de infecção experimental foi determinada por Libanori et al. (2021). Para tal, a *S. agalactiae* foi cultivada em caldo BHI a 30 ° C por 24 h, posteriormente foi semeada em placa de ágar Mueller Hinton contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado para aumentar a patogenicidade da cepa e incubada a 30 ° C por 24 h. Na sequência o inóculo foi cultivado em BHI novamente e nas mesmas condições. Após seu crescimento, este foi então centrifugado a 4.000 g por 30 min a 4 ° C e ressuspensão em 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,65%) nas doses de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  (UFC mL<sup>-1</sup>), de acordo com a escala de McFarland, correlacionadas com a curva de crescimento celular previamente realizada. Todos os peixes receberam 100 µL das respectivas doses, via oral (gavagem) ou intraperitoneal. A mortalidade cumulativa foi avaliada diariamente por 15 dias. A concentração de  $1 \times 10^9$  (UFC mL<sup>-1</sup>) administrada via intraperitoneal promoveu a morte de todos os indivíduos e em menos de três horas, sendo, portanto, descartada para o desafio experimental. A dose escolhida foi a concentração  $1 \times 10^9$  (UFC mL<sup>-1</sup>) aplicada via oral, pois promoveu uma curva de mortalidade menos acentuada e dez dias após infecção observou-se 80% de mortalidade (Figura 2). Esta curva de mortalidade foi previamente realizada por Libanori et al. (2021).

Após 54 dias de suplementação dietética os peixes remanescentes foram infectados com  $1 \times 10^9$  (UFC mL<sup>-1</sup>) via oral e a mortalidade foi monitorada diariamente por 16 dias.

Figura 2: Curva de mortalidade de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* desafiada com *Streptococcus agalactiae* (CP018623) nas concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  (UFC mL<sup>-1</sup>) via gavagem e intraperitoneal para cálculo da dose letal.



### 2.2.6 Análises hematoimunológicas

Seis peixes por tanque foram anestesiados em eugenol (75mg L<sup>-1</sup>) e o sangue coletado por punção do vaso caudal com seringas contendo a solução de anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para as análises hematológicas. Após, o sangue foi utilizado para a confecção de extensões sanguíneas em duplicata e as lâminas coradas com May Grunwald Giemsa-Wright (Ranzani-Paiva et al., 2013). Para contagem diferencial de leucócitos, contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb et al., 1971). Outra parte foi destinada a quantificação do número total de eritrócitos em câmeras de Neubauer, para tal o sangue foi diluição (1:200) em fluido de Dacie modificado de acordo com Blaxhall e Daisley (1973). As análises de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média foram realizadas segundo Ranzani-Paiva et al., (2013).

### 2.2.7 Análises imunológicas

O restante do sangue permaneceu em repouso por 1 h e posteriormente, centrifugou-se por 1.400 g por 15 min a 4°C para obtenção do plasma sanguíneo. O plasma sanguíneo foi agrupado em pool de seis peixes por UE e estocado -20°C para as posteriores análises imunológicas.

A proteína do plasma sanguíneo foi mensurada usando kit comercial de proteína total. A concentração da Imunoglobulina total (Ig) foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar et al. (2000), onde misturou-se 100 µL do plasma com 100 µL de solução de

polietilenoglicol 12% (PEG, 10 000 MW, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) e a mistura foi incubada a 25°C por duas horas, a fim de precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5000 g a 4°C por 10 min), o sobrenadante retirado e mensurado a quantidade de proteína total também pelo kit comercial, utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em mg mL<sup>-1</sup>, sendo calculada pela fórmula:

$$\text{Ig (mg mL}^{-1}\text{)} = \text{proteína total do plasmática} - \text{proteína tratada com PEG.}$$

O título da atividade aglutinante plasmática foi realizado em microplaca de 96 poços de fundo U, onde o plasma foi diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS) no 1° poço (50 µL de solução PBS:50 µL do plasma), sendo diluído serialmente em fator 1:2 para os demais poços até o 12°. Depois disso, foi adicionado 50 µL de bactéria *S. agalactiae* inativada em todos os poços. A microplaca foi incubada a 25°C durante 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada com a observação de um bottom no fundo do poço a olho nu. O título aglutinante foi considerado recíproco a última diluição que apresentou aglutinação (Silva et al., 2009).

O título antimicrobiano plasmático contra a *S. agalactiae* foi realizado em microplaca de 96 poços de fundo chato, de acordo com metodologia utilizada por Silva et al. (2009). O inóculo da *S. agalactiae* foi cultivado em BHI por 24 horas à 28 °C, preparado na concentração de 0,2 na escala de Macfarland e, posteriormente, diluído em meio de cultura Poor broth (PB) a  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. O plasma foi diluído na proporção de 1:3 em Poor broth (PB) no 1° poço (50 µL de plasma: 150 µL de solução PB), diluído serialmente em fator 1:2 para os demais poços. Para o controle positivo e negativo, solução salina foi diluída em PB, da mesma maneira que o plasma. Por fim, 10 µL da *S. agalactiae* foram adicionados aos poços do plasma diluído e no controle positivo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 28 °C. O crescimento do microrganismo foi determinado em leitora de microplaca, no comprimento de onda de 550 nm. O título antimicrobiano do plasma foi recíproco a última diluição que apresentou atividade bactericida, com inibição total do crescimento microbiano.

### 2.2.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Levene para verificar a homocedasticidade da normalidade e variância, respectivamente. Os dados que não apresentaram homogeneidade de variância foram transformados em Log<sub>10</sub> (x + 1). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância unifatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de contagem microbiológica da ração e imunológicos foram submetidos a



análise de variância bifatorial, quando verificada diferença significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Statistica 10.0 e considerou-se a significância de 5%.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Índices zootécnicos

Após 54 dias de ensaio experimental as tilápias alimentadas apenas com ácido benzoico 0,1% apresentaram melhor desempenho para peso final, ganho em peso médio e taxa de crescimento específico em comparação aos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). O incremento no peso final no grupo suplementado com apenas AB<sub>0,1%</sub> foi de 17% e 18% em relação ao grupo controle e o suplementado apenas com *Bacillus* spp., respectivamente. Já para o ganho em peso médio, os peixes suplementados com AB<sub>0,1%</sub>, exibiram aumento de 19% e 21% em comparação ao grupo controle e o suplementado apenas com o *Bacillus* spp., respectivamente. Em contrapartida, a suplementação dietética do mix probiótico *Bacillus* spp. de forma isolada ou em conjunto com o ácido benzoico não foi capaz de promover alterações nos parâmetros zootécnicos (Tabela 2).

Tabela 2: Desempenho zootécnico de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp. ou com ácido benzoico 0,1% em conjunto com *Bacillus* spp. durante 54 dias. Os dados são apresentados em média e desvio padrão.

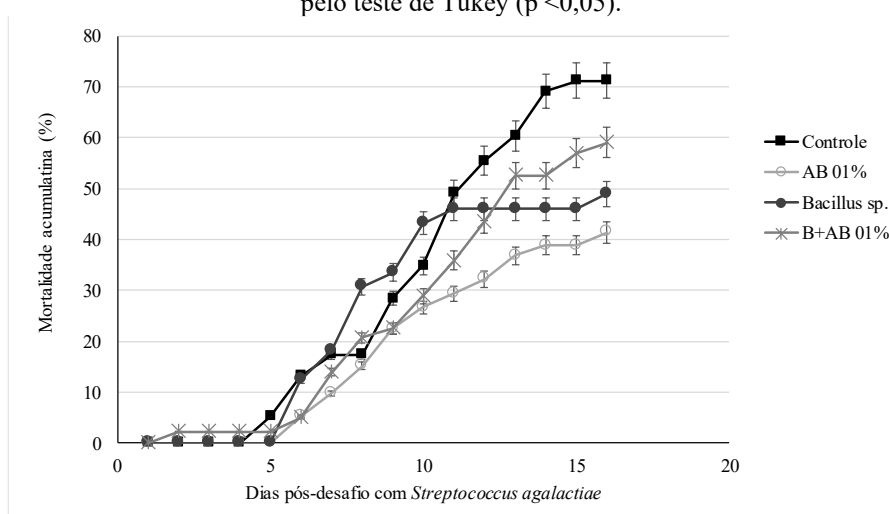
Desempenho Zootécnico	Controle 0%	AB0,1 %	<i>Bacillus</i>	B+AB0,1%	Valor de p
Peso inicial médio (g)	5,76 ± 0,41	5,75 ± 0,36	5,67 ± 0,16	5,85 ± 0,15	0,6574
Biomassa inicial (g)	115,13 ± 8,35	115,07 ± 7,24	115,47 ± 3,58	117,05 ± 2,94	0,6574
Peso médio final (g)	46,12±3,67 <sup>b</sup>	54,08±5,60 <sup>a</sup>	45,69±0,80 <sup>b</sup>	47,24±2,10 <sup>b</sup>	0,009
Biomassa final (g)	788,91 ± 155,43 <sup>b</sup>	1005,99 ± 85,10 <sup>a</sup>	989,28 ± 15,13 <sup>ab</sup>	921,74 ± 111,95 <sup>ab</sup>	0,0326
Ganho de peso médio (g)	40,36±4,10 <sup>b</sup>	48,33±5,23 <sup>a</sup>	39,91±0,93 <sup>b</sup>	41,39±2,25 <sup>b</sup>	0,01
Ganho em biomassa médio (g)	673,77 ± 163,53 <sup>b</sup>	890,93 ± 80,67 <sup>a</sup>	782,81 ± 16,67 <sup>b</sup>	804,69 ± 113,31 <sup>ab</sup>	0,03
Conversão alimentar	1,50 ± 0,15	1,42 ± 0,06	1,45 ± 0,05	1,35 ± 0,14	0,0884
Taxa de crescimento específico	3,85 ± 0,28 <sup>b</sup>	4,14 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,86 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,0062
Sobrevivência (%)	91,98 ± 9,88	96,37 ± 4,58	98,33 ± 2,89	95,00 ± 7,07	0,3132

### 2.3.2 Exposição a *Streptococcus agalactiae* via gavagem

A suplementação de forma isolada de ácido benzoico 0,1% e do mix probiótico *Bacillus* spp. influenciaram positivamente a sobrevivência da tilápia-do-nilo após o desafio via gavagem com *S. agalactiae* em comparação ao grupo controle. (Figura 3). Sendo assim, menor

mortalidade ( $p < 0,05$ ) foi observada nos grupos suplementados de forma isolada com  $AB_{0,1\%}$  e *Bacillus* spp. ( $41,39 \pm 15,64\%$  e  $49,96 \pm 10,24\%$ , respectivamente), quando comparados ao grupo controle ( $76,03 \pm 4,90\%$ ). Já os animais suplementados com o ácido benzoico 0,1% em conjunto com mix probiótico *Bacillus* spp. apresentaram resultados intermediários ( $59,04 \pm 12,64\%$ ) (Figura 3).

Figura 3: Sobrevivência de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp. ou com ácido benzoico 0.1% em conjunto com *Bacillus* spp. após 54 dias, seguida de desafio experimental com *Streptococcus agalactiae* via gavagem ( $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). \*Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



### 2.3.3 Análises hematológicas

Antes da exposição ao patógeno *S. agalactiae*, os parâmetros sanguíneos apresentaram alteração em função da suplementação de *Bacillus* spp. e ácido benzoico isolados ou em conjunto. Neste sentido, o número de trombócitos foi influenciado positivamente independente se a suplementação foi isolada ou em conjunto. A suplementação conjunta do mix probiótico *Bacillus* spp. e o ácido benzoico 0,1% promoveram efeito sinérgico sob a concentração de leucócitos totais, pois houve incremento deste parâmetro, quando comparado aos animais que foram suplementados apenas com  $AB_{0,1\%}$  (Tabela 3). Contudo, a suplementação isolada do mix probiótico *Bacillus* spp. promoveu decréscimo no número de linfócitos, neutrófilo e eosinófilo em comparação aos peixes não suplementados (controle). Entretanto, o número de monócitos apresentou resultados contrários aos anteriores, ou seja, houve incremento desta célula nos peixes suplementados com o mix probiótico *Bacillus* spp. em comparação ao grupo controle.

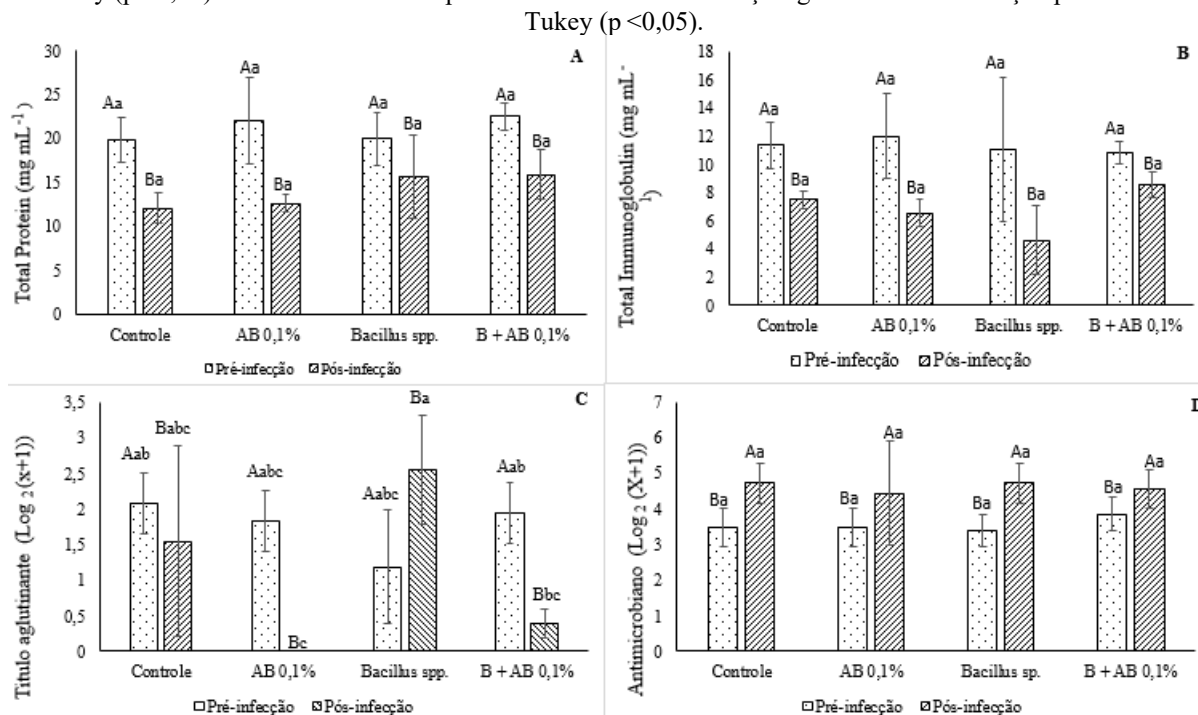
Tabela 3: Parâmetros hematológicos de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp ou com ácido benzoico 0.1% em conjunto com *Bacillus* spp. durante 54 dias. VCM: Volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média.

Variáveis hematológicas	Controle 0%	AB0,1%	<i>Bacillus</i> sp.	B+AB0,1%	valor de p
Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,90 $\pm$ 0,51	2,76 $\pm$ 0,49	3,07 $\pm$ 0,66	3,29 $\pm$ 0,80	0,265
Trombócitos ( $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,51 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	1,98 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	2,86 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	3,17 $\pm$ 2,03 <sup>a</sup>	0,001
Leucócitos totais ( $\times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,90 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup>	2,56 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	3,07 $\pm$ 0,66 <sup>ab</sup>	3,14 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	0,043
Linfócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	233,00 $\pm$ 44,30 <sup>a</sup>	178,00 $\pm$ 60,20 <sup>ab</sup>	175,00 $\pm$ 45,10 <sup>b</sup>	219,00 $\pm$ 75,70 <sup>ab</sup>	0,009
Monócitos ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	22,60 $\pm$ 6,61 <sup>c</sup>	64,30 $\pm$ 3,64 <sup>b</sup>	102,10 $\pm$ 4,27 <sup>a</sup>	89,30 $\pm$ 4,25 <sup>ab</sup>	0,001
Neutrófilo ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	108,00 $\pm$ 9,57 <sup>a</sup>	61,30 $\pm$ 7,20 <sup>ab</sup>	0,28 $\pm$ 6,76 <sup>c</sup>	22,30 $\pm$ 2,27 <sup>bc</sup>	0,001
Eosinófilo ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	50,50 $\pm$ 5,26 <sup>a</sup>	19,60 $\pm$ 2,37 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,001
Basófilo ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	13,30 $\pm$ 1,40	0,95 $\pm$ 0,46	11,30 $\pm$ 0,74	0,68 $\pm$ 0,58	0,095
Hematócrito (%)	31,75 $\pm$ 5,67	32,00 $\pm$ 5,14	29,46 $\pm$ 3,57	30,25 $\pm$ 3,90	0,266
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	8,40 $\pm$ 1,08	7,87 $\pm$ 2,32	7,80 $\pm$ 1,43	8,17 $\pm$ 0,93	0,826
VCM (fL)	1,10 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	1,18 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,96 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	0,003
HCM (g dL <sup>-1</sup> )	0,29 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,05	0,944
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	27,25 $\pm$ 6,96	26,83 $\pm$ 7,33	26,07 $\pm$ 5,39	27,85 $\pm$ 3,07	0,879

### 2.3.4 Análises imunológicas

Com relação a concentração de proteína e imunoglobulina total plasmática, observou-se um decréscimo significativo destes parâmetros após a desafio experimental, demonstrando que infecção foi eficaz e promoveu debilitação do sistema imunológico dos peixes independente da suplementação utilizada. Contudo, não foi possível ver diferença significativa entre as distintas suplementações. No entanto, com relação ao título aglutinante, observou-se aumento na concentração para *Bacillus* (B) pós-infecção. Para o título antimicrobiano não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos que houve um aumento da atividade antimicrobiana na pós-infecção (Figura 4 A, B, C e D).

Figura 4: Parâmetros imunológicos pré e pós-infecção experimental com *Streptococcus agalactiae* via gavagem de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta sem suplementação (controle), suplementada com ácido benzoico 0.1%, com apenas *Bacillus* spp. ou com ácido benzoico 0.1% em conjunto com *Bacillus* spp. durante 54 dias. A) Concentração de proteína total plasmática ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). B) Concentração de imunoglobulina total plasmática ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). C) Título Aglutinante ( $\log_2(X+1)$ ). D) Título Antimicrobiano ( $\log_2(X+1)$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, analisados por ANOVA bifatorial. Para os dados de proteína os valores de p foram: infecção  $< 0,001$ ; tipo de suplementação  $p=0,320$ ; interação  $p= 0,500$ . Para os dados de imunoglobulina os valores de p foram: infecção  $< 0,001$ ; tipo de suplementação  $p=0,975$ ; interação  $p=0,614$ . \* Letras maiúsculas representam diferença significativa entre pré e pós-infecção pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas representam diferentes diferença significativa da interação pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



## 2.4 DISCUSSÃO

O uso de aditivos na alimentação animal pode estimular o sistema imunológico, melhorar o desempenho e bem-estar. Alguns destes, vem sendo estudados como promotores de crescimento, como por exemplo, o uso de ácidos orgânicos (Rodrigues; Meurer; Boscolo, 2015). A suplementação com ácidos orgânicos possui efeitos benéficos, como: maior consumo da dieta, crescimento e saúde da mucosa intestinal (Silva et al., 2017; Tavares-Dias e Mariano, 2015). Fato este observado no presente estudo, onde os animais suplementados com ácido orgânico benzoico a 0,1% (AB<sub>0,1%</sub>) apresentaram melhorias nos parâmetros zootécnicos de biomassa final, peso final, ganho em biomassa, ganho em peso e taxa de crescimento específico em relação aos demais grupos experimentais. Em concordância a estes achados, Libanori et al. (2021) demonstraram que a suplementação dietética de ácido benzoico a na concentração de 01% para tilápia do Nilo apresentou melhores resultados em ganho de peso, biomassa final, taxa de crescimento específico, conversão alimentar, peso médio final e no ganho de biomassa com relação ao grupo controle. Diante do exposto, percebe-se que o ácido benzoico tem potencial

para incrementar os índices produtivos, tanto de animais terrestres quanto aquáticos. Esta melhoria pode estar relacionada a redução do pH intestinal e/ou da dieta promovendo melhor absorção e digestibilidade dos nutrientes. Além disso, os ácidos orgânicos de cadeia curta podem modular a microbiota intestinal de forma a propiciar o crescimento de bactérias benéficas, as quais podem facilitar a nutrição e culminar em melhor taxa de crescimento (Silva et al., 2017; Tavares-Dias e Mariano, 2015).

Contudo, em virtude da escassez de pesquisas avaliando a suplementação de ácido benzoico para peixes, se faz necessário à comparação dos efeitos deste com outros ácidos orgânicos de cadeia curta. O princípio ativo de um ácido orgânico ou de seu sal advém do número de carbono; do formato da cabeça se essa é ramificada, simples ou aromática; do mineral quelante quando suplementado na forma de sal, bem como a quantidade de agrupamentos carboxílicos. O ácido benzoico é classificado como ácido orgânico de cadeia curta, aromático e monocarboxílico (Fiorucci 2002). Sendo assim, a suplementação de Na-butilato monocarboxílico ( $C_4H_7NaO_2$ ) a 0,5% protegido com óleo de palma ou solução tampão para juvenis de tilápia-do-nylo na fase de reversão sexual, também promoveu melhorias nos parâmetros de crescimento (Jesus et al., 2019). Assim como, a suplementação de Ca-propionato ( $C_6H_{10}CaO_4$ ) monocarboxílico a 0,25% para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) também resultou em aumento dos índices produtivos (Pereira et al., 2020). Portanto, a melhoria nos parâmetros de crescimento do presente estudo pode estar relacionada a função dos ácidos orgânicos sobre as diversas vias metabólicas como por exemplo fonte de energia para os animais (Silva et al., 2017), a disponibilização do grupo funcional carboxílico, que é uma molécula fundamental para a geração de energia a partir do ciclo do ácido cítrico ou também chamado de ciclo do ácido tricarboxílico (Nelson e Cox, 2014; Lim et al., 2015).

Adicionalmente a suplementação conjunta de AB<sub>0.1%</sub> com o mix probiótico *Bacillus* spp., não apresentou efeitos sinérgicos sob os parâmetros de crescimento. Entretanto, Agouz et al. (2015) ao suplementarem uma mistura de ácidos orgânicos dicarboxílicos composta de ácido málico ( $C_4H_6O_5$ ), mistura de ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ) 1:1 e sais orgânicos monocarboxílicos composto de Ca-lactato ( $C_6H_{10}CaO_6$ ) e mistura de Na-acetato ( $C_2H_3NaO_2$ ) 1:1, observaram melhorias significativas no peso corporal, comprimento, ganho de peso e taxa de crescimento específico finais de tilápi-do-nylo em comparação com o grupo de controle. Fernandes et al. (2014) avaliaram aditivos como: probióticos, prebióticos, simbióticos e ácidos orgânicos e não encontram diferenças sobre o desempenho de frango de cortes em relação ao grupo controle. Tal fato, pode estar relacionado as concentrações utilizadas e adaptação do ácido orgânico junto ao probiótico (Broom, 2014).

Com relação a sobrevivência após o desafio com *S. agalactiae*, observou-se menor taxa de mortalidade nos peixes suplementados com AB<sub>0.1%</sub> e o mix probiótico *Bacillus* spp. separadamente em comparação ao grupo controle. Semelhante ao encontrado no presente estudo, Ng et al. (2009), verificaram que *Oreochromis* sp. alimentadas com dieta suplementada de ácidos orgânicos nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,3% apresentaram menor mortalidade de 16,6% a 33,3% em relação ao controle 58,3%. Similarmente, Koh et al. (2016) observaram que as dietas suplementadas com os ácidos orgânicos: ácido fórmico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico e ácido cítrico à 0,5% para *Oreochromis* sp. promoveram melhor resistência a infecção experimental com *S. agalactiae*. Portanto, os ácidos orgânicos possuem atividade bacteriostática. Em sua forma indissociável atravessam a membrana celular, dissociam-se no citoplasma fazendo assim com que as bactérias passem a consumir uma grande quantidade de adenosina trifosfato (ATP) para exportar o excesso de prótons e isso pode levar a morte bacteriana (Silva et al., 2017; Tavares-Dias e Mariano, 2015). Esta informação pode explicar a menor taxa de mortalidade nos peixes alimentados com dieta suplementada com AB<sub>0.1%</sub> no presente estudo. Iwashita et al. (2015) também apresentaram dados positivos em relação a sobrevivência de tilápia do Nilo quando alimentadas com dieta a 5 g kg<sup>-1</sup> e 10 g kg<sup>-1</sup> contendo probiótico *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* em relação ao grupo controle desafiadas por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus iniae*. Os probióticos quando administrados desempenham um papel importante na exclusão competitiva de bactérias patogênicas, o que pode explicar os valores de sobrevivência nos peixes suplementados com mix probiótico *Bacillus* spp. Os probióticos também contribuem na fonte de nutrientes e enzimas digestivas, modulação do sistema imunológico, produção de compostos antimicrobianos como bacteriocinas e ácidos orgânicos (Pereira. et al., 2017).

Os padrões hematológicos são uma ferramenta importante para monitorar os estados fisiológicos e alterações patológicas em peixes cultivados (Dias et al., 2020; Ranzani-Paiva et al., 2013). Neste estudo, o número de trombócitos foi influenciado positivamente em todos os tratamentos em relação ao grupo controle indicando que a suplementação isolada ou em conjunto dos aditivos tiveram efeitos positivos neste número. O aumento no número de trombócitos é de grande importância para os peixes, visto que essas células são de defesa orgânica, que atuam na coagulação sanguínea e fagocitose especialmente na remoção de debris celulares (Ranzani-Paiva et al., 2013). Similarmente, Garcia et al. (2012) observaram que a dieta suplementada de 1% de ergosan (complemento alimentar a base de algas marinhas secas) e extratos vegetais de *laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum* para tilápia-do-nilo em condição de estresses agudo induziu o aumento no número de trombócitos circulantes. Jatobá

et al. (2008) também apresentaram efeitos positivos no número de trombócitos para o grupo com dieta suplementada de *Lactobacillus plantarum* submetidos a infecção com *Enterococcus durans*. Dietas administradas com probiótico podem provocar imunoestimulação de trombócitos, o que pode explicar o aumento dessas células uma vez que fazem fagocitose (Nakandakare et al., 2013).

Ainda sobre os parâmetros hematológicos a suplementação separada do mix *Bacillus* spp. promoveu decréscimo no número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos em relação ao grupo controle. Este decréscimo pode estar relacionado ao fornecimento de probióticos na dieta, o que pode provocar imunoestimulação (Jatobá et al., 2008, Jatobá et al., 2011; Nakandakare et al., 2013) ocasionando um alerta ao sistema imune, ou seja, os linfócitos, neutrófilos e eosinófilos podem ter migrado para intestino onde uma concentração maior de *Bacillus* está presente. Contudo, observou-se incremento dos monócitos com a suplementação isolada do mix *Bacillus* spp. em relação ao controle. Os monócitos são células importante para o sistema imune por ser os principais fagócitos em peixes (Iwashita et al., 2015; Ranzani-Paiva et al., 2013). Semelhantemente, Jatobá et al. (2008) relataram que a contagem de monócitos foi maior no grupo com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* submetidos a infecção com *Enterococcus durans*. Kumar et al., (2008) também observaram aumento na contagem de monócitos para *Labeo rohita* quando suplementados com *Bacillus subtilis* após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os probióticos podem modular vários parâmetros imunohematológicos, como interagir com células do sistema imune, como as células fagocíticas mononucleares (monócitos, macrófagos) (Nayak, 2010).

Manter os padrões adequados do sistema imunológico dos peixes é essencial para proteção contra patógenos em geral. Observou-se no presente estudo que não houve diferenças para as proteínas e imunoglobulinas totais plasmáticas entre os tratamentos e o controle. Semelhante ao presente estudo, Wang et al. (2008) não encontraram diferenças na concentração de proteína total para tilapia-do-nilo alimentadas com probiótico *Enterococcus faecium*, Pereira et al. (2016) também não observaram diferenças significativas nas concentrações de proteína total e imunoglobulinas para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) suplementados com (*Weissella cibaria*). De modo igual, Pereira et al. (2020) não observaram diferenças significativas em imunoglobulinas na pré-infecção e pós-infecção em juvenis de jundiá (*Rhamdia quellen*) suplementados com minerais cálcio e sódio, quelados em ácido propiônico. Tal fato, pode estar relacionado ao tempo para o sistema imune produzir anticorpos contra o patógeno durante a infecção (Pereira et al., 2020; Uribe et al., 2011).

O título aglutinante mais alto foi observado em peixes alimentados com mix *Bacillus* (B) na pós-infecção, após o desafio espera-se como resultado ativação da resposta imune para eliminar os patógenos pelo processo de aglutinação. Dessa maneira, Jesus et al. (2017) observaram aumento na concentração de aglutinação para surubins híbridos alimentados com suplementação probiótica de *Weissella cibaria*. No presente trabalho, este fato, pode estar relacionado por bactérias probióticas, como do gênero *Bacillus* estimularem as respostas imunes (Coppola e Turnes, 2004), logo, estimulou de forma positiva as respostas imunológicas específicas como a produção de anticorpos. Peixes alimentados com o mix probiótico *Bacillus* (B) apresentaram uma das menores taxas de mortalidade após o desafio via gavagem com *S. agalactiae* e conseqüentemente melhor sobrevivência, indicando que possivelmente o *Bacillus* colonizou ou foi mantido no intestino o que promoveu a competição com o patógeno.

A atividade antimicrobiana plasmática é considerada uma resposta inespecífica capaz de inibir o crescimento de microrganismos infecciosos (Biller-Takahashi et al., 2013). O aumento desta atividade pode indicar melhora do sistema imune. No presente trabalho, houve aumento em todos os tratamentos e grupo controle após o desafio em função do reconhecimento do patógeno, uma vez que os animais estavam saudáveis e ativados pela resposta imune. Infelizmente, nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos e o grupo controle.

## 2.5 CONCLUSÃO

Em resumo, a suplementação com ácido benzoico a 01% melhorou o crescimento de tilápia-do-nilo e aumentou a sobrevivência após o desafio com *Streptococcus agalactiae*. Conclui-se que o ácido benzoico na concentração 01% é o mais indicado para suplementação dessa espécie. A suplementação conjunta de mix probiótico e ácido benzoico 0,1% não apresentou efeitos sinérgicos sob o desempenho zootécnico, sobrevivência e parâmetros hematoimunológicos, recomenda-se mais estudos para avaliar os efeitos do ácido benzoico em conjunto com o probiótico *Bacillus* spp. na dieta para tilápia do Nilo, bem como menores concentrações de ácido benzoico que não inibiram o crescimento do probiótico.

## 2.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado para G.G. Santos e M.C. Libanori; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para bolsa M.L. Martins (306635 / 2018-6) e J.L.P. Mourino (CNPq 301524 / 2017-3). Este estudo foi parcialmente financiado pelo Código Financeiro CAPES 001. E 155524 / 2018-6 CAPES para bolsa de Pós-



Doutorado para S.A. Pereira. Os autores também agradecem à DSM Nutritional Products pelo fornecimento do produto testado e ao LABBEP pela cepa da bactéria *Streptococcus agalactiae* fornecida ao laboratório AQUOS.

## REFERÊNCIAS

- Adel, M., El-Sayed, A.F.M., Yeganeh, S., Dadar, M., Giri, S.S., 2017. Effect of Potential Probiotic *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* on Growth Performance, Intestinal Microbiota, Digestive Enzyme Activities, and Disease Resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 9, 150–156. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9235-9>
- 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. Nutr. Feed.* 32, 99–108. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2018.153830>
- Albuquerque, D.M., Marengoni, N.G., Boscolo, W.R., Ribeiro, R.P., Mahl, I., de Moura, M.C., 2013. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *Cienc. Rural* 43, 1503–1508. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000800026>
- Albuquerque, D.M., Marengoni, N.G., Mahl, I., de Moura, M.C., Rodriguez-Rodriguez, M. del P., Galo, J.M., Ribeiro, R.P., 2015. *Bacillus* em dietas para alevinos de tilápia do nilo, variedade gift. *Biosci. J.* 31, 532–540. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n2a2015-22506>
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., 2000. Effects-of-dietary-b-carotene-on-the-immune-response-of 1068–1075.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists, in: Cunniff, P.A. (Ed.), *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. AOAC International, Artlington.
- Alvarado, M.A.P., Cervantes Lopez, J., Brana Varela, D., Mariscal Landin, G., Cuaron Ibarqueengoytia, J.A., 2013. Benzoic acid and a product based on *Bacillus* species to protect piglet productivity and the environment. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 4, 447–468.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5, 771–781. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x>
- Broom, L., 2014. When can organic acids and probiotics be used together? *WattPoultry*. Available em: <<http://www.wattagnet.com/articles/18731-when-can-organic-acids-and-probiotics-be-used-together>>. Viewed in em: 20 abr. 2021.
- Buruiana, C.-T., Profir, A.G., Vizireanu, C., 2014. Effects of probiotic. *Res. Microbiol.* 38, 9–17.
- Biller-Takahashi, J., Takahashi, L.S., Pilarski, F., Sebastião, F.A., Urbinati, E.C., 2013. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Arq. Bras. Med. Veterinária Zootec.* 65, 1745–1751.
- Coppola, M.M., Turnes, C.G., 2004. Probióticos e resposta imune Probiotics and immune

response. *Ciência Rural* 34, 1297–1303.

Cyrino, J.E.P., De Almeida Bicudo, Á.J., Sado, R.Y., Borghesi, R., Dairiki, J.K., 2010. A piscicultura e o ambiente - o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 68–87. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300009>

Dias, M.K.R., Yoshioka, E.T.O., Rodriguez, A.F.R., Ribeiro, R.A., Faria, F.D.V.S.E., Almeida Ozório, R.O., Tavares-Dias, M., 2020. Growth and hematological and immunological responses of *Arapaima gigas* fed diets supplemented with immunostimulant based on *Saccharomyces cerevisiae* and subjected to handling stress. *Aquac. Reports* 17, 100335. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100335>

El-Haroun, E.R., Goda, A.M.A.S., Kabir Chowdhury, M.A., 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac. Res.* 37, 1473–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x>

Elsabagh, M., Mohamed, R., Moustafa, E.M., Hamza, A., Farrag, F., Decamp, O., Dawood, M.A.O., Eltholth, M., 2018. Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Nutr.* 24, 1613–1622. <https://doi.org/10.1111/anu.12797>

Fernandes, B.C.S., Martins, M.R.F.B., Mendes, A.A., Milbradt, E.L., Sanfelice, C., Martins, B.B., Aguiar, E.F., Bresne, C., 2014. Intestinal integrity and performance of broiler chickens fed a probiotic, a prebiotic, or an organic acid. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 16, 417–424. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1604417-424>

Fiorucci, A, R., Soares, M, H, F, B., Cavalheiro, E, T, G., 2002. Ácidos orgânicos: dos Primórdios da Química Experimental à Sua Presença em Nosso Cotidiano. *Rev. ION* 31, 55–58. <https://doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018009>

Facimoto, C.T., Chideroli, R.T., Gonçalves, D.D., Carmo, A.O., Kalaphtakis, E., Pereira, P.U., 2017. crossm Whole-Genome Sequence of Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. *Am. Soc. Microbiol.* 5, 9–10.

Garcia, F., Schalch, S.H.C., Onaka, E.M., Fonseca, F.S., Batista, M.P., 2012. Hematologia de tilápia-do-nilo alimentada com suplemento à base de algas frente a desafios de estresse agudo e crônico. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 64, 198–204. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000100028>

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. *Rev. Bras. Zootec.* 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. *Am. J. Clin. Pathol.* 56, 35–39.

Halas, D., Hansen, C.F., Hampson, D.J., Mullan, B.P., Kim, J.C., Wilson, R.H., Pluske, J.R., 2010. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. *Anim.*

Feed Sci. Technol. 160, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.001>

Hindu, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J., 2019. A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. *Aquac. Int.* 27, 227–238. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0318-3>

Hoshino, M.D.F.G., Marinho, R. das G.B., Pereira, D.F., Yoshioca, E.T.O., Tavares-Dias, M., Ozorio, R.O. de A., Rodrigues, A.F.R., Ribeiro, R.A., Faria, F.S.E.D.V. de, 2017. Hematological and biochemical responses of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) fed with diets containing a glucomannan product derived from yeast and algae. *Acta Amaz.* 47, 87–94. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201700781>

Iwashita, M.K.P., Nakandakare, I.B., Terhune, J.S., Wood, T., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2015. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.008>

Jatobá, A., Vieira, F.D.N., Neto, C.B., Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Jerônimo, G.T., Dotta, G., Martins, M.L., 2008. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43, 1201–1207. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900015>

Jatobá, A., Vieira, F.N., Buglione-Neto, C.C., Mouriño, J.L.P., Silva, B.C., Seiffter, W.Q., Andreatta, E.R., 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 725–732. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9472-5>

Jesus, G.F.A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Addam, K., Silva, B.C., Sterzelecki, F.C., Sugai, J.K., Cardoso, L., Jatobá, A., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2019. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. *Aquaculture* 504, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.018>

Jesus, G.F.A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Addam, K., Silva, B.C., Sterzelecki, F.C., Sugai, J.K., Cardoso, L., Jatobá, A., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2019. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. *Aquaculture* 504, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.018>

Koh, C.B., Romano, N., Zahrah, A.S., Ng, W.K., 2016. 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*. *Aquac. Res.* 47, 357–369. <https://doi.org/10.1111/are.12492>

Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R., Nayak, S.K., 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.008>

Lazzari, R., Bergamin, G.T., Emanuelli, T., Ribeiro, C.P., 2011. Densidade de estocagem no

crescimento, composição e perfil lipídico corporal do jundiá Stocking density in growth, composition and body lipid profile of jundiá. *Ciência Rural* 41, 712–718.

Leira, M.H., Lago, A. A., Viana, J. A., Cunha, L. T., Mendonça, F. G., Freitas, R. T., 2017. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil : revisão de literatura. *Nutr. Time* 14, 15.

Lim, C., Lückstädt, C., Webster, C.D., Kesius, P., 2015. Organic acids and their salts. *Diet. Nutr. Addit. Fish Heal.* 305–319. <https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch15>

Libanori, M.C.M., Santos, G.G., Pereira, S.A., Lopes, G.R., Owatari, M.S., Soligo, T.A., Yamashita, E., Pereira, U.P., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2021. Dietary supplementation with benzoic organic acid improves the growth performance and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after challenge with *Streptococcus agalactiae* (Group B). *Aquaculture* 545, 737204. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737204>

Mello, H. De, Moraes, J.R.E., Niza, I.G., Moraes, F.R. De, Ozório, R.O.A., Shimada, M.T., Filho Engracia, J.R.E.R., Claudiano, G.S., 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia-do-nilo. *Pesqui. Vet. Bras.* 33, 724–730. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>

Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquac. Nutr.* 16, 496–503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x>

Michael, S.E., Abarike, E.D., Cai, J., 2019. A Review on the Probiotic Effects on Haematological Parameters in Fish. *J. Fish.* 13, 25–31. <https://doi.org/10.36648/1307-234x.13.3.166>

Nakandakare, I.B., Iwashita, M.K.P., Dias, D. de C., Tachibana, L., Ranzani-Paiva, M.J.T., Romagosa, E., 2013. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-nilo: Parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol. do Inst. Pesca* 39, 121–135.

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

Nelson, David, L., Cox, Michael, M., 2014. *Principios de Bioquímica de Lehninger, Antropologia ambiental.* <https://doi.org/10.2307/j.ctvk8vxxm.7>

Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K., Siti-Zahrah, A., 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquac. Res.* 40, 1490–1500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02249.x>

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.R., 2017. Benzoic acid (CAS 65-85-0). *Rev. Virtual Quim.* 9, 2673–2687. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160156>

- 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). *Aquac. Eng.* 82, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.001>
- Pereira, G. do V., Jesus, G.F.A., Vieira, F. do N., Pereira, S.A., Ushizima, T.T., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2016. Probiotic supplementation in diet and vaccination of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *P. corruscans*♂). *Ciência Rural* 46, 348–353. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150543>
- Pereira, G.R., Pires, H.S., Ferreira, L.S.B.P.F., Kangerski, W.K., 2017. Piscicultura Continental com enfoque agroecológico. *J. Chem. Inf. Model.* 110, 1689–1699.
- Pereira, S.A., Jesus, G.F.A., Pereira, G. V., Silva, B.C., Sá, L.S., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2020. The Chelating Mineral on Organic Acid Salts Modulates the Dynamics and Richness of the Intestinal Microbiota of a Silver Catfish *Rhamdia quelen*. *Curr. Microbiol.* 77, 1483–1495. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01962-z>
- Ramírez, N.B., Seiffert, W.Q., Vieira, F. do N., Pedreira Mouriño, J.L., Alves Jesus, G.F., Ferreira, G.S., Andreatta, E.R., 2013. Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 48, 913–919. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800015>
- Ranzani-paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes.
- Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M., El-Araby, I.E., 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 50, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.040>
- Rodrigues, R., Meurer, F., Boscolo, W.R., 2015. Additives in Fish Nutrition. *Rev. Colomb. Ciencias Animais* 7, 228–236.
- Santos-Junior, M.M., Candia, E.W.S., de Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Mouriño, J.L.P., Vieira, F. do N., 2016. Suplementação dietética com probiótico e butirato de sódio no pré-berçário de *Litopenaeus vannamei*. *Bol. do Inst. Pesca* 42, 457–463. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n2p457>
- Scapinello, C., De Faria, H.G., Furlan, A.C., Michelan, A.C., 2001. Efeito da Utilização de Oligossacarídeo Manose e Acidificantes sobre o Desempenho de Coelho em Crescimento. *Rev. Bras. Zootec.* 30, 1272–1277. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982001000500021>
- Silva, B.C., Jesus Gabriel Fernandes Alves, Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2017. Ácidos Orgânicos: Uma nova ferramenta nutricional para a aquicultura. *Aquac. Bras.* 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. *Pesqui. Vet. Bras.* 29, 869–873. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2009001100002>
- Silva, R.F., Lanna, E.A.T., Bomfim, M.A.D., Ribeiro, F.B., Assis-Júnior, F.I., Navarro, R.D., 2008. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. *Rev. Ceres* 55, 352–355.

Silva, B.C., Marchiori, N., 2018. Importância do manejo alimentar na criação de tilápia. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural Santa Catarina.

Tachibana, L., Dias, D.C., Ishikawa, C.M., Corrêa, C.F., Fernando, A., Leonardo, G., Ranzani-paiva, M.J.T., 2011. Probiótico na alimentação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), durante a inversão sexual: desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos* 25, 25–31.

Tachibana, L., Telli, G.S., Dias, D. de C., Gonçalves, G.S., Guimarães, M.C., Ishikawa, C.M., Cavalcante, R.B., Natori, M.M., Fernandez Alarcon, M.F., Tapia-Paniagua, S., Moriñigo, M.Á., Moyano, F.J., de Araújo, E.R.L., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2021. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on growth performance, gut microbiota modulation and innate immunology. *Aquac. Res.* 52, 1630–1642. <https://doi.org/10.1111/are.15016>

Tavares-Dias, M., Barcellos, J.F.M., Marcon, J.L., Menezes, G.C., Ono, E.A., Affonso, E.G., 2007. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. *Museum* 1822, 61–68.

Tavares-Dias, M., Mariano, W, S., 2015. Aquicultura no Brasil : Novas Perspectivas para a Produção 1, 1–2.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 56, 486–503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>

Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T., Li, W. fen, 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 277, 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.007>

Yin, X., Mu, L., Bian, X., Wu, L., Li, B., Liu, J., Guo, Z., Ye, J., 2018. Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 74, 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.023>

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível avaliar os efeitos dietéticos do mix probiótico de *Bacillus* spp. em conjunto com o ácido benzoico para tilápia-do-nilo bem como, avaliar os efeitos do mesmo sob os parâmetros zootécnicos e hematoimunológicos. Levando em consideração os parâmetros analisados a suplementação dietética com ácido benzoico 0,1% foi o aditivo mais adequado para tilápia do Nilo pois melhorou o desempenho como já apresentado na dissertação. Além disso, os animais alimentados com suplementação dietética com ácido benzoico 0,1% apresentaram menor mortalidade após o desafio com *Streptococcus agalactiae*. Portanto, o ácido benzoico na concentração 01% é o mais indicado para suplementação de tilápia-do-nilo.

Este estudo foi o primeiro a avaliar a suplementação conjunta de ácido benzoico e probiótico *Bacillus* spp. para tilápia-do-nilo. No entanto, não foi possível encontrar sinergismo e melhora dos parâmetros zootécnicos e saúde dos animais alimentados com a dieta suplementada do mix probiótico *Bacillus* spp. e o ácido benzoico 0,1%. Enfatiza, que mais estudos são necessários para avaliar os efeitos do ácido benzoico em conjunto com o probiótico *Bacillus* spp., como testes para determinar outras concentrações do ácido benzoico em menores valores que possam permitir o crescimento de *Bacillus*, bem como um maior período *in vivo* experimental para melhores resultados.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ADDAM, K. G. S. **Mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial para *Oreochromis niloticus***. 2018 (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2018.
- ADDAM, K. G. S. et al. Dietary organic acids blend alone or in combination with an essential oil on the survival, growth, gut/liver structure and de hemato-immunological in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 10, p. 2960–2971, 2019.
- AFRILASARI, W.; WIDANARNI; MERYANDINI, A. Effect of Probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the Population of Intestinal Microflora, Digestive Enzyme Activity and the Growth of Catfish (*Clarias* sp.). **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 23, n. 4, p. 168–172, 2016.
- AGBOOLA, A. F. et al. Effects of organic acid and probiotic on performance and gut morphology in broiler chickens. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 45, n. 5, p. 494–501, 2015.
- AL-AJLANI, MUTAZ, M.; HASNAIN, S. Bacteria Exhibiting Antimicrobial Activities; Screening for Antibiotics and the Associated Genetic Studies. **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 1, n. 1, p. 230–238, 2010.
- ALBUQUERQUE, D. M. et al. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 8, p. 1503–1508, 2013.
- ALBUQUERQUE, D. M. et al. *Bacillus* em dietas para alevinos de tilápia do nilo, variedade gift. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 532–540, 2015.
- ALVARADO, M. A. P. et al. Benzoic acid and a product based on *Bacillus* species to protect piglet productivity and the environment. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v. 4, n. 4, p. 447–468, 2013.
- ALY, S. M. et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1–2, p. 128–136, 2008.
- 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.
- ANDRADE, T, J, V.; SOUZA, F, A.; MORAIS, C, R. Avaliação do Florfenicol como tratamento Preventivo de doenças bacterianas no cultivo de tilápias em sistema superintensivo. **Gestão, Tecnologia e Ciências**, v. 11, n. 2238–4405, p. 92–105, 2017.
- ASENCIOS, Y, O. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 74–79, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2021. **Anuário 2021 Peixe Br**, p. 71, 2021.



BOSCOLO, W. R. et al. Desempenho e características de carcaça de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de gordura. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 443–447, 2004.

BOZKURT, M. et al. The effect of single or combined dietary supplementation of prebiotics, organic acid and probiotics on performance and slaughter characteristics of broilers. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 39, n. 3, p. 197–205, 2009.

BRASIL. Constituição (1999). Constitucional nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. **Define O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, Cria A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e Dá Outras Providências..** Brasília, DF, 26 jan. 1999.

BRASIL. Assembleia Legislativa. Constituição (2004). Lei nº 13, de 01 de dezembro de 2004. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo.** Brasília, DF, 01 dez. 2004.

BROOM, L. When can organic acids and probiotics be used together? **WattPoultry**, 2014. <<http://www.wattagnet.com/articles/18731-when-can-organic-acids-and-probiotics-be-used-together>>. Viewed in em: 20 abr. 2021.

BURR, G. et al. A preliminary in vitro assessment of GroBiotic®-A, brewer's yeast and fructooligosaccharide as prebiotics for the red drum *Sciaenops ocellatus*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 43, n. 03601234, p. 253–260, 2008.

BURUIANA, C.-T.; PROFIR, A. G.; VIZIREANU, C. Effects of probiotic. **Research in Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 9–17, 2014.

CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. **Aquaculture**, v. 472, p. 144–155, 2017.

CAVALHEIRO, A. C. M. et al. Microingredientes utilizados em alimentação de peixes em cativeiro – Revisão Use of microingredients in farmed fish feeding – a Review. **Ciências veterinárias**, v. 109, n. 589590, p. 11–20, 2014.

CONROY, G. Estreptococosis en tilapia: Prevalencia de las especies de *Streptococcus* en América Latina y sus manifestaciones patológicas. **Intervet/Schering-Plough Animal Health**, p. 15–20, 2009.

CORNÉLIO, F. H. G. et al. Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 863–870, 2013.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid (VevoVital®) on the performance and jejunal digestive physiology in young pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2016.

DOTTA, G.; PIAZZA, R. **Manejo e Sanidade no Cultivo.** Instituto Federal do Paraná, 2012. 1-136.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.** [s.l: s.n.].

FAO, E.; OMS, E. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. **Estudios FAO alimentación y nutrición**, v. 85, n. 10142916, p. 52, 2006.

FULLER R. Probiotics in man and animals, a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, pp.365–378, 1989.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147–165, 1999.

GHELER, T. R. et al. Use of benzoic acid for piglets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2182–2187, 2009.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 4, p. 287–292, 1999.

HINDU, S, V. et al. A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227–238, 2019.

HILSDORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias-vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.22, p.73-84, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>. Acessado em 23 de agosto de 2021

JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201–1207, 2008.

JESUS, G. F. A. et al. Probiotic bacteria may prevent haemorrhagic septicaemia by maturing intestinal host defences in Brazilian native surubins. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 484–491, 2016.

KNARREBORG, A. et al. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 99, n. 1–4, p. 131–140, 2002.

KUBITZA, F. Panorama da Aquicultura. **Panorama**, v. 21, n. 1519114, p. 1–68, 2005.

KUEBUTORNYE, F. K. A. et al. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 819–841, 2020.

KUEBUTORNYE, F. K. A.; ABARIKE, E. D.; LU, Y. A review on the application of

*Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 87, n. February, p. 820–828, 2019.

LEIRA, M. H. et al. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **Pubvet**, v. 11, n. 6, p. 538–544, 2017a.

LEIRA, M. H. et al. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil : revisão de literatura. **Nutri Time**, v. 14, n. 2, p. 15, 2017b.

LIM, C. et al. Organic acids and their salts. **Dietary Nutrients, Additives and Fish Health**, p. 305–319, 2015.

LOH, J. The role of probiotics and their mechanisms of action: an aquaculture perspective. **World Aquaculture**, v. 48, n. 1, p. 19–23, 2017.

LÜCKSTÄDTS, C. The use of acidifiers in fisheries and aquaculture. In: **Acidifiers in Animal Nutrition: A Guide to Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance** (LÜCKSTÄDTS, C. ed.), p. 71 – 79. Nottingham University Press, United Kingdom, 2007.

LÜCKSTÄDTS, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 44 (3), p. 1 – 8, 2008.

MEIRELLES, F. S. D. E. **Estudo epidemiológico das infecções bacteriana as em tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivadas em Pernambuco**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

MERRIFIELD, D. L.; CARNEVALI, O. Probiotic modulation of the gut microbiota of fish. **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**, p. 185–222, 2014.

MORELLI, L.; CAPURSO, L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, n. SUPPL. 1, p. 10–11, 2012.

MOURIÑO, J. L. P. **Suplementação dietética com simbiótico para o híbrido de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*P. fasciatum*)**. 2010. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; VIEIRA, F. N.; MARTINS, M. L. Probióticos na aquicultura. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M.; (org.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá: ABRAPOA, 2012. p. 381-404.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 2–14, 2010.

NEVES, S. C. V. **Ácido fumárico em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo**. 2018. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

NG, W. K.; KOH, C. B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 342–368, 2017.

OLIVEIRA, P. H. R.; REIS, R. R. Benzoic acid (CAS 65-85-0). **Revista Virtual de Quimica**, v. 9, n. 6, p. 2673–2687, 2017.

PEREIRA, G. DO V. et al. Probiotic supplementation in diet and vaccination of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *P. corruscans*♂). **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 348–353, 2016.

PEREIRA, G. R. et al. Piscicultura Continental com enfoque agroecológico. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 110, n. 9, p. 1689–1699, 2017.

PEREIRA, S. A. **Suplementação dietética do ácido propionico quelado aos minerais cálcio ou sódio para juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* ( Siluriforme : Heptapteridae )**. 2019. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

PRABU, E. et al. Tilapia – An Excellent Candidate Species for World Aquaculture: A Review. **Annual Research & Review in Biology**, n. March, p. 1–14, 2019.

RAMÍREZ, N. C. B. et al. Effect of dietary supplementation with butyrate and probiotic on the survival of Pacific white shrimp after challenge with *Vibrio alginolyticus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 6, p. 471–477, 2017.

RIBEIRO, P. A. P.; LEANDRO, S. C.; LOGATO, P. V. R. PROBIÓTICOS NA AQUICULTURA. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p. 837–846, 2008.

RODJAN, P. et al. Effect of organic acids or probiotics alone or in combination on growth performance, nutrient digestibility, enzyme activities, intestinal morphology and gut microflora in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 2, p. e931–e940, 2018.

RODRIGUES, R.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R. Additives in Fish Nutrition. **Revista Colombiana Ciencias Animais**, v. 7, n. 2, p. 228–236, 2015.

RODRÍGUEZ-LECOMPTE, J. C. et al. The effect of microbial-nutrient interaction on the immune system of young chicks after early probiotic and organic acid administration. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 7, p. 2246–2254, 2012.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SANTOS-JUNIOR, M. M. et al. Suplementação dietética com probiótico e butirato de sódio no pré-berçário de *Litopenaeus vannamei*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 2, p. 457–463, 2016.

SANTOS C, H, A.; LOURENÇO J, A.; IGARASHI M, A. Crescimento de Tilápia do Nilo alimentados com peixes marinhos provenientes da pesca do camarão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 185–192, 2007.

- SCAPINELLO, C. et al. Efeito da Utilização de Oligossacarídeo Manose e Acidificantes sobre o Desempenho de Coelhos em Crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1272–1277, 2001.
- SILVA, B. C. et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384–387, p. 104–110, 2013.
- SILVA, B. C. **Sais orgânicos como aditivos alimentares para camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2014. Tese (Doutorado em aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- SILVA, L. E. S.; GALÍCIO, G. S. Alimentação de Peixes em Piscicultura Intensiva. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, p. 49–62, 2012.
- SILVA, R. F. et al. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 352–355, 2008.
- SIQUEIRA, T. V. DE. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. **Revista do BNDES**, v. 25, n. 49, p. 119–170, 2018.
- TACHIBANA, L. et al. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on growth performance, gut microbiota modulation and innate immunology. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 4, p. 1630–1642, 2021.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913–918, 2017.
- TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas Para a Prevenção E O Controle De Patógenos Em Piscicultura Alternatives for the Prevention and Control of Pathogens in Fish Farming. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335–341, 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. 1–3, p. 210–213, 2007.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.
- YAMASHITA, M.M. **Suplementação dietária com probiótico em tilápia do nilo como prevenção à estreptococose**. 2015. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Univesidade federal de Santa Catarina. Florianopolis, 2015.
- WOLFERNDEN, A. D. et al. **Effect of Organic Acids and Probiotics on Salmonella enteritidis Infection in Broiler Chickens**, 2007.