

Tatiana Vieira Poletto

***Aeromonas veronii* COMO CANDIDATA A PROBIÓTICO PARA  
O JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*): EFEITOS NO DESEMPENHO E  
DIGESTIBILIDADE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Aquicultura da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em  
Aquicultura

Orientadora: Dra. Débora Machado Fracalossi  
Coorientadora: Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira

Florianópolis  
2015

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

Poletto, Tatiana Vieira

Aeromonas veronii COMO CANDIDATA A PROBIÓTICO PARA O  
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*): EFEITOS NO DESEMPENHO E  
DIGESTIBILIDADE / Tatiana Vieira Poletto ; orientadora,  
Débora Machado Fracalossi ; coorientadora, Cleide Rosana  
Werneck Vieira. - Florianópolis, SC, 2015.

101 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. probiótico. 3. carboidrato. 4.  
Aeromonas veronii. 5. jundiá. I. Fracalossi, Débora  
Machado. II. Vieira, Cleide Rosana Werneck. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura. IV. Título.

***Aeromonas veronii* como candidata a probiótico para o jundiá  
(*Rhamdia quelen*): efeitos no desempenho e digestibilidade**

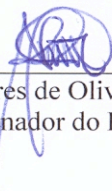
Por

TATIANA VIEIRA POLETTO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

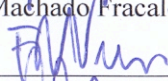
**DOUTOR EM AQUICULTURA**

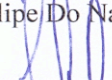
e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

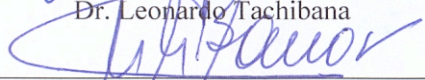
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Débora Machado Fracalossi – *Orientadora*

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Felipe Do Nascimento Vieira

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Luiz Pedreira Moura

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Leonardo Tachibana

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Margarida Maria Barros

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira



Dedico esta tese aos meus amados pais **Roberto e Mara**, que de maneira carinhosa e companheira me educaram e apoiaram durante todos os anos da minha vida. Muito obrigada por acreditarem sempre e por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos!



## AGRADECIMENTOS

À profa. Débora, agradeço imensamente o acolhimento em seu laboratório e a confiança na realização deste trabalho. Agradeço também pela forma afetuosa e precisa de nos guiar em todas as etapas desta tese, sempre com um sorriso no rosto, mesmo nos momentos de adversidade. Muito mais do que uma orientadora, és um exemplo de competência, conhecimento, paixão à profissão e parceria. Obrigada pela oportunidade de poder aprender tanto contigo, não apenas as lições acadêmicas, mas também as de vida.

À professora Cleide Rosana Werneck Vieira, pelos ensinamentos e excelente convivência em seu laboratório.

Ao Prof. Eduardo, por sempre estar pronto a ajudar e por tê-lo feito sem jamais hesitar.

Ao professor José Luiz Pedreira Mouriño, pela presença e ajuda em todas as etapas deste trabalho, com excelentes ideias inspiradoras.

Ao prof. Carlos Peres, pela grande ajuda e pelos ensinamentos.

À Dra. Maria do Carmo Gominho Rosa por toda ajuda desde o embrião desta tese.

Aos muitos técnicos de todos os laboratórios pelos quais eu passei e que ajudaram MUITO.

Ao Dr. Éder Carlos Schmidt, pelos ensinamentos, por toda a ajuda e por todas risadas.

Ao prof. Felipe Vieira, pelas muitas contribuições dadas a este trabalho.

Ao Carlito e Jeff, por serem estes profissionais e amigos, sempre dispostos à ajudar.

Aos colegas da aquicultura meu MUITO OBRIGADA.

Aos meus mestres do programa de Pós-Graduação em Aquicultura e todos os que já passaram pela minha vida, MUITO OBRIGADA pelos exemplos que ajudaram a construir a pessoa que sou hoje.

À toda equipe do LABNUTRI e LAPAD que tornaram esta jornada MUITO mais divertida e possível: Débora, Soninha, Mary, Dariane, Jefferson, Bruna, Amarilis, Camila, Renatinha, Luiz Eduardo

Squid, Liziane, Vitor, Fernando, Adriano, Jorge, Lucas, Natyta, Bruno, Penélope, Janice, Tharniê, Ana Paula, Alan, Ricardo, Douglas, Fernando Cornélio, Maitê, Evoy, Alex, Luciano, John, Gicella, Jaque, Patrick, Claudinha, Renata, Pedro, Ronaldo, Samara e Denis.

Agradeço muito meus irmãos de LABNUTRI, Lula e Cami, que sempre estiveram muito próximos e ajudaram imensamente na realização deste trabalho. Contem SEMPRE comigo, como eu pude contar com vocês.

À toda equipe do Laboratório de microbiologia: Cleide, Helen, Marília, Priscila, Clarissa e Karin.

À equipe do Laboratório de bioquímica de insetos: Carlos, Daniele e Roseane

À amiga Miriam por toda ajuda e risadas durante as tentativas de análise que deram (ou não) certo.

À Scheila Pereira, Gabriela Tomas e Gabriela Hashimoto pela valiosíssima ajuda.

À minha irmã Carolina pela parceria eterna, minha vó Rosa pela torcida e a toda minha família pelo apoio.

Ao meu querido namorado Fernando, por todo seu incentivo e ajuda, sempre de forma amorosa, em todas as etapas deste trabalho.



## RESUMO

Uma cepa de bactéria amilolítica potencialmente probiótica foi isolada do intestino do jundiá (*Rhamdia quelen*), visando melhorar a digestibilidade de carboidratos em peixes. Duas de 31 cepas isoladas do intestino anterior foram consideradas amilolíticas e a que produziu maior halo pela secreção da amilase, foi a escolhida. A cepa foi caracterizada fenotipicamente e analisada para determinação da sua tolerância frente à bile e pH, além da análise quantitativa da atividade enzimática da amilase. A candidata probiótica, identificada como *Aeromonas veronii*, mostrou a capacidade de sobreviver a diversos níveis de pH e sais biliares, além de secretar um interessante perfil enzimático. A utilização da bactéria amilolítica *A. veronii* como suplemento probiótico na dieta foi analisada com relação ao crescimento, digestibilidade de nutrientes e histologia do jundiá, peixe onívoro, com intestino curto. No ensaio de digestibilidade, os peixes ( $425,6 \pm 159,94$  g) foram alimentados em triplicata com dieta suplementada ou não com 107 unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. veronii* por g-1 de dieta, por 79 dias. Foi utilizado o marcador inerte óxido de ítrio nas dietas experimentais, as fezes foram coletadas por sedimentação e os intestinos coletados para análise histológica. O coeficiente de digestibilidade aparente e nutriente digestível para fibra alimentar total foram maiores ( $P < 0,05$ ) nos peixes que receberam a dieta controle, mas não houve efeito na digestibilidade do amido. Não foram observadas alterações histológicas intestinais significativas com a suplementação da bactéria probiótica. O crescimento dos peixes foi avaliado em outro ensaio, onde os peixes ( $26,19 \pm 0,32$  g) foram alimentados com as mesmas dietas do ensaio de digestibilidade, por 45 dias. O peso final e ganho em peso foram maiores nos peixes alimentados com a dieta controle, sem probiótico. Apesar da suplementação dietética com a bactéria amilolítica não melhorar a digestibilidade do amido na dieta, há indícios que a *A. veronii* degrade o amido e este fique mais disponível para o jundiá aproveitá-lo, porém, talvez esta espécie de peixe não consiga utilizar de forma eficiente o carboidrato disponibilizado pela bactéria.

Palavras-chave: Aquicultura, probiótico, carboidrato, *Aeromonas veronii*, jundiá



## ABSTRACT

A strain of a potential probiotic amylolytic bacterium was isolated from the gut of jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) aiming at improving carbohydrate digestibility in fish. Two of 31 strains isolated from the foregut were considered amylolytic and the strain selected was the one which presented the higher halo provided by the amylase secretion. The strain was phenotypically characterized and analysed to determine bile and pH tolerance as well extracellular quantitative amylase activity. The probiotic candidate, identified as *Aeromonas veronii*, showed the ability to survive a range of pH and bile salt conditions and secreted an interesting enzymatic profile. The use of *A. veronii* as a dietary probiotic supplement was analysed for growth, nutrient digestibility and histology of jundiá catfish. In the digestibility trial, fish ( $425.6 \pm 159.94$  g) were fed in triplicate with diets supplemented or not with 109 colony-forming units (CFU) of *A. veronii* per 100 g-1 on a diet, for 79 days. Feces were collected by sedimentation and the foreguts collected for histological analysis. The apparent digestibility coefficient and digestible nutrient of total dietary fiber were higher ( $P < 0.05$ ) in fish fed the control diet, but there was no effect on starch digestibility. No significant changes were observed in intestinal histology with dietary bacterial probiotic supplementation. Fish growth was evaluated in another trial, where fish ( $26.19 \pm 0.32$  g) were fed the same diets used on the digestibility trial, for 45 days. The final weight and weight gain were higher in fish fed the control diet without probiotic supplementation. Although dietary supplementation with the amylolytic bacteria does not improve the digestibility of starch in the diet, there are indications that *A. veronii* degrade starch making it more available to the fish. However, maybe jundiá cannot efficiently use the carbohydrate provided by bacterium degradation.

Keywords: Aquaculture, probiotic, carbohydrate, *Aeromonas veronii*, jundiá catfish



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Tolerância da *Aeromonas veronii* a diferentes níveis de pH após 2 h de incubação em TSB. Resultados estão expressos em Log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> da sobrevivência da bactéria em diferentes pHs (médias ± SE)..... 46
- Figura 2** Tolerância da *Aeromonas veronii* a sais biliares após 2 h (□), 4 h (■) e 8 h (■) de incubação em TSB. Resultados estão expressos em Log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> da sobrevivência da bactéria em diferentes concentrações de bile (médias ± SE) ..... 47
- Figura 3** Imagem panorâmica da porção mediana e detalhe de corte transversal da porção mediano-distal do intestino de jundiá (*Ramdia quelen*). Dieta controle (A) e dieta suplementada com bactéria (B). Camada muscular (m), vilosidades (v), lâmina própria (lp), células caliciformes (cabeça de seta), borda em escova (seta). Coloração: Papanicolau. Barras: 1mm (panorâmica) e 25 μ (detalhe) ..... 70



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> Classificação dos carboidratos pela presença nos alimentos .  | 21 |
| <b>Tabela 2</b> Perfil enzimático (API ZYM test) da candidata a probiótico <i>A. veronii</i> .....  | 45 |
| <b>Tabela 3</b> Composição percentual e proximal da dieta experimental (base seca).....   | 64 |
| <b>Tabela 4</b> Coeficiente de digestibilidade aparente, nutrientes e energia digestíveis da dieta contendo ou não a suplementação da bactéria amilolítica probiótica <i>Aeromonas veronii</i> . Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média.....                     | 69 |
| <b>Tabela 5</b> Variáveis de desempenho de juvenis de jundiá alimentados com dieta contendo ou não suplementação com a bactéria amilolítica probiótica <i>Aeromonas veronii</i> , durante 45 dias. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média.....                   | 71 |
| <b>Tabela 6</b> Composição corporal (na matéria úmida) de juvenis de jundiá, alimentados com dieta contendo ou não a suplementação com a bactéria amilolítica probiótica <i>Aeromonas veronii</i> , durante 45 dias. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média..... | 71 |





## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 19 |
| ALIMENTAÇÃO NA AQUICULTURA .....  | 19 |
| CARBOIDRATO NA NUTRIÇÃO DE PEIXES .....   | 20 |
| O JUNDIÁ .....  | 24 |
| BACTÉRIAS PROBIÓTICAS .....   | 24 |
| <i>Possíveis modos de ação atribuídos aos probióticos:</i> .....  | 26 |
| <i>Bactérias probióticas utilizadas na aquicultura</i> .....  | 26 |
| ENZIMAS ENDÓGENAS E EXÓGENAS .....  | 27 |
| EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA DIETA SOBRE AS<br>ATIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS .....                     | 28 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | 33 |
| OBJETIVO GERAL .....  | 33 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 33 |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....  | 35 |
| <b>Artigo 1</b> .....   | 35 |
| <b><i>AEROMONAS VERONII</i> COMO POTENCIAL PROBIÓTICO<br/>PARA <i>Rhamdia quelen</i>.</b> .....                         | 35 |
| RESUMO .....  | 37 |
| INTRODUÇÃO .....  | 38 |
| MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 39 |
| <i>Isolamento</i> .....   | 39 |
| <i>Detecção de bactérias produtoras de amilase</i> .....  | 39 |
| <i>Determinação de possíveis efeitos prejudiciais causados pelas<br/>        cepas selecionadas ao hospedeiro</i> ..... | 39 |
| <i>Caracterização fenotípica</i> .....  | 40 |
| <i>Ensaio qualitativo da amilase</i> .....  | 40 |
| <i>Identificação molecular</i> .....  | 40 |
| <i>Ensaio quantitativo da amilase</i> .....   | 41 |
| <i>Caracterização enzimática</i> .....  | 42 |
| <i>Tolerância frente a diferentes pH e bile</i> .....   | 42 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 42 |
| AGRADECIMENTOS .....  | 47 |
| CONFLITO DE INTERESSES .....  | 47 |
| REFERÊNCIAS .....   | 48 |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....  | 59 |
| <b>Artigo 2</b> .....   | 59 |

|   |    |
|---|----|
| <b>SUPLEMENTAÇÃO DE BACTÉRIA PROBIÓTICA AMILOLÍTICA NA DIETA DO JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>): EFEITO NO CRESCIMENTO, HISTOLOGIA INTESTINAL E UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES</b> ..... | 59 |
| RESUMO.....   | 61 |
| INTRODUÇÃO .....  | 62 |
| MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 63 |
| <i>Dieta experimental</i> .....   | 63 |
| <i>Bactéria probiótica e suplementação do inóculo à dieta</i> .....   | 65 |
| <i>Ensaio de digestibilidade</i> .....  | 65 |
| <i>Análises histológicas</i> .....  | 66 |
| <i>Ensaio de Desempenho</i> .....   | 67 |
| <i>Análises químicas comum a ambos os ensaios</i> .....   | 68 |
| <i>Análises Estatísticas</i> .....  | 68 |
| RESULTADOS .....  | 68 |
| <i>Digestibilidade</i> .....  | 68 |
| <i>Análises histológicas</i> .....  | 69 |
| DISCUSSÃO .....   | 71 |
| REFERÊNCIAS .....   | 74 |
| <b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....  | 87 |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 89 |
| <b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 91 |

## **CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL**

A aquicultura está se desenvolvendo rapidamente e continua sendo o setor de produção alimentar de origem animal que cresce com maior rapidez (FAO, 2015). Fatores que impulsionam este crescimento estão cada dia mais relacionados à nutrição e alimentação das espécies com interesse comercial, já que são essenciais para alcançar a eficiência da produção. Por meio de numerosas pesquisas, cada dia mais conhecimentos são adquiridos para se atender às exigências nutricionais das espécies-alvo, mas ainda há muito o que se buscar, principalmente com relação a fontes alternativas de alimentos que possam substituir, sobretudo a farinha de peixe das dietas, que proporcionem a redução nos custos da produção, preservando a sustentabilidade financeira, além de focar na diminuição do impacto ambiental ocasionado pelo setor (CASTILLO; GATLIN, 2015; NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2011; SINGH; BALANGE; GHUGHUSKAR, 2006). Estas fontes de alimento alternativas podem ser de variadas origens e tipos, como vegetais, subprodutos do processamento animal e microrganismos (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2013; KIESSLING; ASKBRANDT, 1993; KUHN et al., 2009; OLIVA-TELES; GONCALVES, 2001; SLAWSKI et al., 2013; WANG et al., 2013; YUN et al., 2014).

### **Alimentação na aquicultura**

Os custos com a produção aquícola podem ser reduzidos pela eficiente formulação de dietas para a espécie-alvo da produção (GANGULY et al., 2013). Os peixes apresentam exigências nutricionais variadas e uma capacidade de utilizar fontes alimentares disponíveis igualmente variada, ditadas principalmente pelo hábito alimentar da espécie. Para a maioria das espécies produzidas, ainda é utilizada na formulação das dietas a farinha de peixe em grandes quantidades, sendo esta a principal fonte de proteína nos alimentos para aquicultura, cuja inclusão podem variar entre 20 e 60% das dietas (GLENCROSS; BOOTH; ALLAN, 2007; WATANABE, 2002). Porém, com as drásticas diminuições dos estoques pesqueiros, a disponibilidade da farinha de peixe está comprometida tornando este, um dos ingredientes mais caros da dieta (GATLIN et al., 2007) e limitante para o desenvolvimento de um setor aquícola sustentável.

## Carboidrato na nutrição de peixes

Os carboidratos são compostos orgânicos constituídos de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), sendo os compostos mais abundantes na natureza, com origem primária no processo de fotossíntese, quando a energia luminosa da radiação solar é incorporada às ligações químicas da molécula de glicose (MELO, 2004).

Os carboidratos são classificados, pelo grupo funcional, em aldoses (presença do grupo funcional aldeído) e cetoses (presença do grupo funcional cetona), sendo classificadas pelo número de carbonos em sua estrutura, mas também pela sua localização no alimento (Tabela 1), sendo esta última classificação de maior interesse para a área de nutrição (SILVA et al., 2014).

A agroindústria disponibiliza grandes quantidades de produtos e subprodutos a base de ingredientes de origem vegetal, ricos em carboidratos. Esta alta disponibilidade acaba interferindo positivamente nos seus custos, deixando-os bastante acessíveis e conseqüentemente imprimindo um grande potencial de utilização destes insumos nas dietas para espécies aquícolas.

Dentro os carboidratos, alguns se destacam pela sua qualidade como fonte de energia ou pela sua disponibilidade, como é o caso do milho (*Zea mays*), um dos mais importantes cereais produzidos no mundo. No Brasil, é bastante utilizado como fonte energética na alimentação animal, inclusive para a formulação de dietas para peixes.

**Tabela 1** Classificação dos carboidratos pela presença nos alimentos.

| Classificação   | Tipo  |
|---|---|
| 1. Livres ou não associados à estrutura celular do alimento | A. Lactose do leite<br>B. Frutose do mel<br>C. Trealose da hemolinfa (sangue dos insetos)   |
| 2. Intracelulares ou dentro da célula                       | A. Solúveis – dissolvidos no citosol celular<br>B. Polissacarídeos de reserva<br>a. Amido (vegetal)<br>1. Amilose, $\alpha$ 1-4 polímero de glicose<br>2. Amilopectina, $\alpha$ 1-4 e $\alpha$ 1-6 polímero de glicose<br>b. Glicogênio (animal) $\alpha$ 1-4 e $\alpha$ 1-6 polímero de glicose<br>c. Frutanos<br>1. Levana, $\beta$ 2-6 polímero de frutose (bactérias)<br>2. Inulina, $\beta$ 2-1 polímero de frutose (planta Asteraceae) |
| 3. Parede celular   | A. Celulose, $\beta$ 1-4 polímero de glicose<br>B. Hemicelulose, $\beta$ 1-4 polímero de xilose<br>C. Pectina, $\alpha$ 1-4 ácido galacturônico<br>D. Gomas, $\beta$ 1-4 e $\beta$ 1-3 polímero de vários açúcares<br>E. Lignina, polímero de fenilpropanoide (não é carboidrato)   |
| 3. Quitina - $\beta$ 1-4 polímero de N-acetilglicosamina    | A. Exoesqueleto<br>B. Parede celular  |

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

O amido e os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) são componentes dos carboidratos que perfazem a maioria dos ingredientes vegetais utilizados para a produção de alimentos na aquicultura (STONE; ALLAN; ANDERSON, 2003). O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza, sendo uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores, além de fonte de energia alimentar para muitos organismos (VIEILLE; ZEIKUS; VIEILLE, 2001). Os polissacarídeos podem ser divididos em amido - que são homopolímeros de glicose com ligações  $\alpha$ -glucosídicas ( $\alpha$ -glucanos) lineares (amilose) ou ramificados (amilopectinas) - e polissacarídeos não-amiláceos (ASP, 1996). A proporção de amilose e amilopectina costuma variar de 20-30% e 70-80%, respectivamente (GALLANT et al., 1992). Além dos compostos polissacarídeos não amiláceos, os amidos também contêm fibras (KRAUGERUD et al., 2007) e fatores antinutricionais que

influenciam negativamente a palatabilidade e valor nutricional (TRIPATHI; MISHRA, 2007), também afetando diretamente a digestibilidade da dieta (DREW; BORGESON; THIESSEN, 2007).

Embora não existam exigências de carboidratos em dietas para peixes (NRC, 2011), sua inclusão em níveis adequados pode assegurar melhor eficiência na utilização de outros nutrientes (WILSON, 1994), com efeitos positivos sobre o crescimento e digestibilidade (HUNG et al., 2003; LI et al., 2013; WATANABE, 2002). Entretanto, o contrário também pode ocorrer, caso a inclusão de carboidratos na dieta seja realizada em quantidades inadequadas, prejudicando nutricionalmente o organismo, seu metabolismo, sua saúde, além do seu crescimento (ERFANULLAH; JAFRI, 1998).

No ambiente aquático as fontes de carboidratos são escassas em comparação ao ambiente terrestre; por este motivo, houve a adaptação dos sistemas digestórios e metabólicos dos peixes para utilização da proteína e lipídio como fonte energética (WALTON; COWEY, 1982). A característica que, aparentemente, mais influi na habilidade do peixe em utilizar o carboidrato, de forma geral, é o hábito alimentar da espécie, sendo que os onívoros e herbívoros o fazem de forma melhor, provavelmente pelas diferenças funcionais e anatômicas do trato digestório e órgãos associados, do que aquelas espécies carnívoras, menos aptas (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; RODRIGUES et al., 2012). Também há diferenciação de utilização de carboidratos entre espécies de águas temperadas e tropicais, sendo as de águas tropicais mais adaptadas (WILSON, 1994). Espécies como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a carpa comum (*Cyprinus carpio*) conseguem utilizar de forma mais eficiente os carboidratos (entre 30 e 50% de inclusão na dieta), diferentemente das espécies carnívoras (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002; WILSON, 1994).

A digestibilidade do amido em peixes pode ser afetada pela origem vegetal, estado físico do amido (se houve tratamento térmico/gelatinização, complexidade molecular e peso molecular) e níveis da sua inclusão na dieta (STONE; ALLAN; ANDERSON, 2003; WILSON, 1994), porém o que ditará a eficiência da digestibilidade sobre todos esses fatores, será a atividade das enzimas digestivas endógenas dos peixes (STONE; ALLAN; ANDERSON, 2003) ou das enzimas exógenas, das bactérias associadas ao intestino dos mesmos.

A habilidade para a utilização dos alimentos depende da capacidade fisiológica de digerir e da transformação dos nutrientes ingeridos (FURNE et al., 2008). A digestão de carboidratos em peixes é

iniciada no estômago, intestino e cecos pilóricos (nas espécies que os apresentam), com a hidrólise extracelular dos carboidratos mais complexos e por outras carboidrases que atuam na borda da membrana do intestino anterior (RUST, 2002). As atividades das carboidrases são influenciadas por fatores que interferem na capacidade de digerir os carboidratos da dieta, como a temperatura, estação do ano, idade (KUZ'MINA, 1996), além da frequência alimentar (UGOLEV; KUZ'MINA, 1994). Dentre todas as enzimas, a mais importante na digestão dos carboidratos é a  $\alpha$ -amilase, que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 (LOVELL, 1988) e está localizada em todo o trato gastrointestinal de várias espécies de peixes (KROGDAHL et al., 2005). A  $\alpha$ -1,4 amilase pancreática atua de forma aleatória no interior da cadeia, reduzindo o peso molecular do amido e disponibilizando maltose (dissacarídeo com duas glicoses unidas por uma ligação  $\alpha$ -1,4), maltotriose (trissacarídeo de glicoses unidas por ligações  $\alpha$ -1,4) e dextrinas (glicoses unidas por ligações  $\alpha$ -1,4  $\alpha$ -1,6). O processo continua e as enzimas da borda em escova (maltase, que quebra a maltose e a  $\alpha$ -dextrinase que atua na ligação  $\alpha$ -1,6 da dextrina), quebram os oligossacarídeos e liberam glicose livre para ser absorvida (SILVA et al., 2014). Logo em seguida à ingestão do carboidrato, o nível de glicose sanguínea em peixes aumenta rapidamente e assim permanece por um período extenso de tempo (horas) (GOUVEIA; DAVIES, 2004; PANSERAT et al., 2001). O aumento de glicose livre pode influenciar na produção da amilase pelo tecido pancreático ou estimular a liberação de insulina pelo pâncreas, que estimulará a produção de amilase (JOBLING, 1994). O aumento na inclusão de carboidratos na dieta induziu o aumento da atividade da amilase em peixes como o pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004), larvas de robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (CAHU; INFANTE, 1994; PÉRES et al., 1996), pós-larvas de linguado *Solea senegalensis* (RIBEIRO; CAHU; DINIS, 2002) e juvenis do jundiá (*Rhamdia quelen*) (MELO, 2004).

O processo de gelatinização ocorre com o tratamento do amido no processamento da dieta, pela combinação de alta pressão, alta temperatura e umidade que atuam nas pontes de hidrogênio, entre as cadeias polissacarídicas, ligadas à estrutura do grânulo (BARRON et al., 2001; CHENG; HARDY, 2003). Este processo destrói a estrutura granular do amido, dissolvendo e despolimerizando suas macromoléculas (BARRON et al., 2001), deixando-o mais digestível pelos organismos (GARCÍA-ALONSO et al., 1999). Grande parte das espécies de peixes é beneficiada com o processo de gelatinização do amido pelo aumento na digestibilidade aparente do amido e/ou da

energia (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; WILSON, 1994), independente do hábito alimentar da espécie como é o caso do robalo europeu (PERES; OLIVA-TELES, 2002), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (BERGOT; BREQUE, 1983; KIM; KAUSHIK, 1992), dourada (*Sparus aurata*) (VENOU et al., 2003), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (KRAUGERUD et al., 2007), perca prateada (*Bidyanus bidyanus*) (STONE; ALLAN; ANDERSON, 2003) e esturjão siberiano (*Acipenser baeri*) (KAUSHIK et al., 1989).

## **O jundiá**

O jundiá (Siluriformes, Heptapteridae), espécie alvo deste estudo, vem sobressaindo dentre as espécies cultivadas no sul do Brasil, Argentina e Uruguai pela facilidade de manejo e reprodução, boa eficiência alimentar, sabor apreciado e ausência de espinhos intramusculares (FRACALOSSO; ZANIBONI FILHO; MEURER, 2002). Porém, o hábito alimentar desta espécie é controverso na literatura. Segundo Kramer e Bryant (1995), o jundiá deve ser classificado como espécie onívora, pois os autores levaram em consideração os itens presentes no trato digestório do peixe selvagem. Outro estudo, realizado por García de Marco (1995), de modo diferente, o classificou como espécie carnívora, baseando-se pela morfologia do organismo, que apresenta reduzido coeficiente intestinal.

Alguns estudos realizados pela equipe do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI/UFSC) já sugerem a baixa eficiência do jundiá na utilização do carboidrato da dieta em relação a outros onívoros (GOMINHO-ROSA et al., 2015; MORO et al., 2010; OLIVEIRA-FILHO; FRACALOSSO, 2006; RODRIGUES et al., 2012) e, recentemente, Gominho-Rosa (2012) determinou como proporção ideal de fonte de energia não-proteica na dieta para juvenis, as quantidades de 60 e 120 g kg<sup>-1</sup> de amido, pois em maiores inclusões, houve sobrecarga metabólica por excesso de carboidratos, prejudicando a saúde dos peixes. O estudo de Gominho-Rosa (2012) também mostrou que a variação na digestibilidade do amido pelo jundiá ocorre como resposta adaptativa às fontes de amido pela variação na atividade da maltase e não da amilase.

## **Bactérias probióticas**

O termo probiótico denota “a favor da vida” e deriva do latim e do grego respectivamente, sendo que “pro” significa “em favor de” e “biotikos” significa “vida”. Desde 1965, seu conceito vem sendo



moldado de acordo com os novos resultados encontrados pelas pesquisas científicas que utilizam estes microrganismos benéficos. Acredita-se que a primeira definição de probióticos foi dada por Lilly e Stillwell (1965), que avaliaram os probióticos como sendo “substâncias secretadas por protozoários que estimulariam o crescimento de outros microrganismos”. A redefinição do conceito de probióticos foi dada por Parker (1974) como sendo “suplementos alimentares, inclusive microrganismos, que quando acrescentados aos alimentos e rações alterariam o equilíbrio da microbiota intestinal dos animais”. Fuller (1989) aprimorou a definição dizendo que os probióticos são “bactérias vivas que suplementadas aos alimentos favorecem o equilíbrio da microbiota intestinal de um hospedeiro, com efeitos benéficos”.

Somente após anos, conhecendo-se melhor as diferenças que existem entre as espécies aquáticas e terrestres com relação às interações da microbiota intestinal e o ambiente circundante, é que o conceito de probióticos foi estendido para o campo da aquicultura, quando Gatesoupe (1999) alterou a definição de probióticos como sendo “células microbianas que, quando administradas a animais, colonizam o trato gastrointestinal e permanecem viáveis, melhorando sua saúde”. Porém, ainda mais recentemente, Verschuere et al., (2000) definiram com maior amplitude o conceito de probióticos, contemplando, de melhor forma, as possibilidades de atuação destes microrganismos definindo-os como “suplementos microbianos vivos que têm efeito benéfico ao hospedeiro, por meio da modificação da comunidade microbiana associada ao hospedeiro ou ao ambiente de cultivo, proporcionando melhor utilização do alimento ou melhorando seu valor nutricional, melhorando a resposta imunológica do hospedeiro a doenças ou melhorando a qualidade da água de criação”. Apesar do relativo pouco tempo e da abrangência da última definição sobre os probióticos para a aquicultura, a mesma apresenta uma grande defasagem sobre os conhecimentos mais recentes, já que há vários trabalhos que demonstram o benefício da utilização de células inativadas de bactérias ao hospedeiro (IRIANTO; AUSTIN, 2003; RODRIGUEZ-ESTRADA et al., 2013; SONG et al., 2006; TAOKA et al., 2006), ao contrário do que foi delimitado por Vershuere e colaboradores, que caracterizaram como probióticos somente os “suplementos microbianos vivos”. Os termos “probiotes” ou “bactérias benéficas” também são sinônimos utilizados para bactérias probióticas.

*Possíveis modos de ação atribuídos aos probióticos:*

I. Antagonismo frente a patógenos, por meio da produção de compostos inibitórios e competição por nutrientes (RINGØ; VADSTEIN, 1998; GRAM; et al., 1999; VERSCHUERE et al., 2000).

II. Habilidade das células em produzir metabólitos (como vitaminas) e enzimas, melhorando os processos digestivos e a disponibilização de nutrientes (BUTS et al., 1999; EL-HAROUN; GODA; KABIR CHOWDHURY, 2006; LARA-FLORES et al., 2003).

III. Habilidade de adesão e colonização (LARA-FLORES, 2011).

IV. Melhorias do sistema imune (ASHRAF; SHAH, 2014).

V. Melhoria da qualidade da água (VERSHUERE et al, 2000).

*Bactérias probióticas utilizadas na aquicultura*

A utilização das bactérias probióticas na aquicultura, deve considerar a importante e intrínseca relação que os organismos aquáticos têm com o seu ambiente direto, em comparação com os organismos terrestres (KESARCODI-WATSON et al., 2008). As bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas são as dominantes nos tratos digestórios de peixes e bivalves, mas a microbiota intestinal dos organismos aquáticos pode sofrer alterações de forma rápida, promeio da entrada de microrganismos transportados pela água ou pelo alimento (GATESOUBE, 1999). Esta é, possivelmente, a razão pela qual os probióticos que são utilizados no ambiente aquático devem ser isolados do próprio ambiente aquático (CHAUCHEYRAS-DURAND; DURAND, 2010) ou do próprio trato gastrointestinal do organismo. O probiótico ideal deve ter habilidade para colonizar, se estabilizar e se multiplicar no trato gastrointestinal do hospedeiro. Porém, os probióticos comerciais utilizados na aquicultura, na sua maioria, não são originados de peixes, mesmo que exista consenso científico de que há uma maior capacidade de competição intestinal por aquelas bactérias isoladas da flora autóctone do hospedeiro (NAYAK, 2010).

Embora os probióticos para humanos e animais terrestres sejam predominantemente bactérias ácido-láticas, muitos outros gêneros, *Bacillus* spp., inclusive bactérias Gram-negativas (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photorhodobacterium*, *Pseudomonas* e espécies de *Vibrios*) vem sendo avaliadas como probióticos para organismos aquáticos (GATESOUBE, 1999; KESARCODI-WATSON et al., 2008; MERRIFIELD et al., 2010; NAYAK, 2010; VINE; LEUKES; KAISER, 2006; WANG; LI; LIN, 2008), podendo ser empregados em ovos de peixes e larvas, peixes juvenis e adultos, crustáceos, moluscos bivalves

e, também, no alimento vivo como Artêmia, rotíferos ou algas unicelulares (VERSCHUERE et al., 2000).

### **Enzimas endógenas e exógenas**

Atualmente, pesquisas no campo da biotecnologia, voltadas às bactérias probióticas, contribuíram para a intensificação dos sistemas de produção aquícola. Porém, com estes estudos em voga, viu-se que, além de produzirem efeitos inibitórios diretos contra bactérias patogênicas, causadoras de doenças na aquicultura (BALCÁZAR et al., 2006), as bactérias probióticas também exercem outras formas importantes de benefício ao hospedeiro, como nos processos digestivos e nutricionais de animais aquáticos (RINGØ; STROM; TABACHEK, 1995), por meio da produção de enzimas (BAGHERI et al., 2008; BOMBA et al., 2002; PANIGRAHI et al., 2004; WACHÉ et al., 2006; YANBO; ZIRONG, 2006), vitaminas, aminoácidos essenciais e atividades microbianas no trato digestório (DALL; MORIARTY, 1983).

O trato digestório dos peixes marinhos e de água doce possui microflora típica, que pode ser dividida em autóctone (microflora padrão) e alóctone (RINGØ; BIRKBECK, 1999). Essas bactérias gastrointestinais realizam parte da decomposição dos nutrientes e fornecem a seu hospedeiro substâncias metabolicamente ativas como enzimas, aminoácidos e vitaminas (SUGITA; KAWASAKI; DEGUCHI, 1997).

A digestão dos alimentos é dependente de três fatores principais: (1) o tipo de alimento ingerido e seu grau de suscetibilidade frente às enzimas digestivas, (2) a atividade das enzimas digestivas e (3) o período de tempo de exposição do alimento à ação das enzimas digestivas, sendo cada um desses fatores afetado por ampla gama de fatores secundários (RAY; GHOSH; RINGØ, 2012).

As enzimas digestivas são um dos mais importantes fatores que influenciam a eficiência da utilização do alimento nos peixes e a caracterização dessas enzimas ditam a capacidade digestiva do peixe em hidrolisar carboidratos, proteínas e lipídios dos alimentos ingeridos (LEMIEUX; BLIER; DUTIL, 1999). Entretanto, o conhecimento sobre as enzimas extracelulares produzidas pelas bactérias intestinais e sua significância bioquímica ainda é limitado (BAIRAGI et al., 2002; KAR; GHOSH, 2008).

A relação das enzimas digestivas com os microrganismos presentes no trato gastrointestinal dos organismos aquáticos tem importante papel no processo digestivo pelo aumento da atividade

enzimática total do intestino (ZIAEI-NEJAD et al., 2006) e estímulo da produção de enzimas endógenas (OCHOA-SOLANO; OLMOS-SOTO, 2006; WANG, 2007), o que ocasiona o aumento da digestibilidade do alimento.

Um importante efeito da utilização de probióticos, que ainda não é muito estudado, mas demonstra importante potencial para a aquicultura, é a melhora da eficiência alimentar e, conseqüente, melhora do crescimento de organismos aquáticos pela suplementação dessas bactérias benéficas na dieta (GATESOUBE, 2002; LARA-FLORES et al., 2003).

O probiótico, após transitar através do estômago, adere-se ao intestino do hospedeiro, utiliza grande quantidade de carboidratos para o seu crescimento e produz enzimas digestivas importantes como a amilases, proteases e lipases, que aumentam a digestibilidade da matéria orgânica, podendo determinar melhor crescimento do hospedeiro, prevenindo problemas intestinais e produzindo e/ou estimulando a pré-digestão de compostos secundários de fontes de proteínas vegetais (EL-HAROON; GODA; KABIR CHOWDHURY, 2006; LARA-FLORES et al., 2003).

### **Efeitos da suplementação de probióticos na dieta sobre as atividades de enzimas digestivas**

Já foi demonstrado em animais terrestres que os probióticos influenciam os processos digestivos pelo aumento da população de microrganismos benéficos, aumentando assim as atividades enzimáticas microbianas e atividades enzimáticas digestivas na membrana borda em escova (BUTS et al., 1999), sendo o resultado, melhora da digestibilidade dos nutrientes e melhora da utilização do alimento oferecido ao animal (BOMBA et al., 2002).

Resultados similares foram relatados em espécies aquícolas, como a carpa comum (YANBO; ZIRONG, 2006), a truta arco-íris (BAGHERI et al., 2008; PANIGRAHI et al., 2004; WACHÉ et al., 2006) e tilápia-do-Nilo (LARA-FLORES et al., 2003). A utilização de probióticos suplementados a dietas para organismos aquáticos é promissora quando melhora a eficiência alimentar desses animais e foi este o resultado encontrado no estudo de Sáenz de Rodrigáñez et al. (2009), sugerindo que a capacidade absorptiva da membrana borda em escova e, possivelmente, a subseqüente utilização nutritiva do alimento sejam mais eficientes no linguado (*Solea senegalensis*) alimentado com

dieta suplementada com probióticos do que em peixes alimentados com a dieta sem o probiótico.

Vários autores propõem como explicação que os probióticos (I) estimulam as atividades específicas e totais das enzimas digestivas (BUTS et al., 1999); e (II) produzem ativamente enzimas relevantes, tais como amilases, proteases e lipases (EL-HAROUN; GODA; KABIR CHOWDHURY, 2006; SCHRIJVER; OLLEVIER, 2000). Assim, os probióticos devem melhorar todo o processo digestivo aumentando a digestibilidade da ração e, desse modo, a utilização dos nutrientes

No estudo realizado por Douillet e Langdon (1993) com ostras (*Cassostrea gigas*) axênicas (sem microrganismos), alimentadas com dieta monoalgal (também axênica) e inoculada com várias bactérias marinhas, uma cepa de *Alteromonas* sp. mostrou efeitos benéficos no crescimento e sobrevivência das larvas de ostra. O modo de ação sugerido pelos autores foi o de fornecimento nutricional por meio da fixação de nitrogênio, já que a dieta monoalgal poderia ser insuficiente como fonte deste nutriente para as ostras no estágio larval, ou pelo auxílio na digestão das microalgas ingeridas pelas enzimas extracelulares bacterianas.

Yanbo e Zirong (2006) utilizaram *Bacillus* spp. e bactérias fotossintéticas suplementadas à dieta da carpa comum e observaram melhora na atividade de enzimas digestivas, melhor desempenho de crescimento e eficiência alimentar nestes tratamentos em relação às carpas alimentadas com ração controle, sugerindo que a adição de probióticos pode inclusive reduzir o custo de produção. Em termos práticos, isto significa que a utilização de probióticos pode diminuir a quantidade de ração necessária para o crescimento do animal, o que pode resultar em vantajosa redução de custos, já que a alimentação é justamente a parte mais onerosa do cultivo. Outro autor também encontrou resultados similares para a carpa indiana (GHOSH et al., 2003).

Mohapatra et al. (2012) utilizaram diferentes tratamentos com e sem probióticos (*Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*), suplementados à dieta basal em diversas combinações para larvas de carpa indiana (*Labeo rohita*). As larvas que apresentaram melhor resultado em crescimento, taxa de retenção proteica, eficiência de retenção de nutrientes, digestibilidade e a mais baixa taxa de conversão alimentar foram àquelas alimentadas com dieta suplementada com todos os microrganismos, indicando que a combinação de vários probióticos propiciam um melhor desempenho de crescimento e utilização dos nutrientes. Este estudo também testou os efeitos da

utilização de microrganismos inativados por calor, mas o resultado foi ineficaz na melhora do crescimento, utilização de nutrientes e atividade das enzimas digestivas. A ineficiência do probiótico inativado levou os autores a concluir que a maior atividade das enzimas digestivas (protease e lipase), encontrada nas dietas suplementadas com probióticos, é originada do estímulo dos próprios probiontes ou da produção de enzimas exógenas, as quais podem ter melhorado a digestibilidade dos nutrientes, o que conduziu ao melhor desempenho das larvas.

Viu-se até agora que os processos digestivos dos organismos aquáticos podem ser afetados de maneira benéfica pela utilização dos probióticos suplementados às dietas desses animais. Alguns autores atribuem diretamente ao probiótico o efeito de melhora da digestibilidade dos nutrientes ingeridos pelo hospedeiro através da secreção de enzimas exógenas. Entretanto, outros autores, cujos estudos serão abordados na sequência desta revisão, sugerem um modo de ação divergente do que a secreção direta de enzimas digestivas pelos próprios microrganismos, onde os microrganismos benéficos estimulariam de alguma forma uma maior secreção de enzimas digestivas pelos próprios hospedeiros, potencializando assim a digestão e a captação dos nutrientes ingeridos.

Sun et al. (2011) utilizaram o probiótico *Psychrobacter* sp. suplementado à dieta e observaram um aumento da atividade das enzimas protease e amilase intestinais em garoupas (*Epinephelus coioides*). Entretanto, os autores realizaram estudos que demonstraram que a bactéria *Psychrobacter* sp. não secretou, sob condições *in vitro*, nenhuma protease, amilase ou lipase, fato interessante que indica fortemente que as enzimas exógenas produzidas pelo probionte no intestino são insignificantes e que o aumento da atividade das enzimas deve ser totalmente atribuída à indução que o probiótico faz ao seu hospedeiro, evento que ocorreu nos peixes alimentados com a dieta suplementada no estudo. Assim, o aumento observado da atividade das enzimas digestivas nas dietas suplementadas com probióticos pode ter levado a uma melhora geral do processo digestivo, aumentando a digestibilidade do alimento e acarretando numa melhor utilização dos nutrientes da dieta (SUN et al., 2011).

Wang (2007) em estudo com o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) argumenta que não foi possível distinguir entre as atividades vinculadas às enzimas sintetizadas pelo camarão e àquelas vinculadas às enzimas sintetizadas pelos probióticos. Este autor sugere que as enzimas exógenas produzidas pelos probióticos representam

apenas uma pequena contribuição à atividade de enzima total do intestino e que a presença dos probióticos estimularia mais intensamente a produção de enzimas endógenas pelo próprio camarão.

De forma geral, como apontado por vários autores, o que se sabe é que as enzimas digestivas (amilases, proteases e lipases) podem ser incrementadas pela administração de probióticos na dieta (GÓMEZ; SHEN, 2008; WANG, 2007; ZIAEI-NEJAD et al., 2006).

Lara-Flores et al. (2010) avaliaram os efeitos de dois tipos de probióticos, um mix de duas bactérias (*Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), no desempenho de crescimento e atividade das enzimas intestinais em larvas de tilápia do Nilo. Os resultados observados foram uma alta atividade de fosfatase alcalina na tilápia quando os probióticos eram administrados a dieta, refletindo um possível desenvolvimento das membranas borda em escova dos enterócitos que pode ser estimulada pelos probióticos (CUVIER-PÉRES; KESTEMONT, 2001).

As atividades das enzimas da borda em escova são relatadas como indicadoras da intensidade de absorção de nutrientes pelos enterócitos dos peixes (GAWLICKA et al., 2000). A fosfatase alcalina é concentrada em tecidos contendo bordas em escova, portanto ela está presente no mesmo local onde as enzimas digestivas são secretadas, permitindo a absorção de pequenas partículas, à medida que elas são produzidas (TENGGJAROENKUL et al., 2000). A atividade da fosfatase alcalina também foi relatada como sendo indicadora da absorção de carboidrato e lipídio (CALHAU et al., 2000; GERMAN et al., 2004).

Sáenz de Rodríguez et al. (2009) realizaram um estudo com o linguado Senegalês sendo a dieta suplementada com as bactérias probióticas liofilizadas da família *Alteromonadaceae* Pdp13 e Pdp11. O maior crescimento foi registrado nos peixes alimentados com dieta suplementada com Pdp13. O efeito da suplementação dos probióticos no intestino foi avaliado de três formas: (a) avaliação da atividade de duas enzimas específicas intestinais localizadas na membrana borda em escova, a leucina aminopeptidase (LA) e fosfatase alcalina (FA); (b) análise das estruturas das células intestinais e (c) monitoramento da microbiota do intestino. Essas enzimas são indicadores de maturação do enterócitos e diferenciação, por meio do desenvolvimento ontogenético de peixes marinhos (CAHU; INFANTE, 1995), além de serem relacionadas com o estado nutricional do animal, onde suas atividades refletem uma digestão e/ou absorção adequadas de alimento. O aumento da presença de FA no intestino dos linguados alimentados com dieta suplementada com Pdp13 pode indicar uma maior funcionalidade dos

enterócitos em comparação ao grupo controle. Resultados similares foram relatados para a tilápia nilótica por El-Haroun et al. (2006) e para o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) por Carnevali et al. (2006).

Outro grupo de autores (GARCÍA DE LA BANDA et al., 2010) realizou estudo com a mesma espécie de linguado (*Solea senegalensis*) e as bactérias probióticas Pdp13 (*S. baltica*) e Pdp11 (*S. putrefaciens*) do estudo antecessor, realizado por Saénz de Rodrigáñez et al. (2009). Porém, resultados diversos foram encontrados, possivelmente pelas temperaturas distintas em que cada experimento foi conduzido, sendo o estudo mais antigo realizado a 21 °C e o mais novo a 16,6 °C ocasionando resultado geral inferior aos peixes controle e àqueles alimentados com dieta suplementada com Pdp13. No estudo realizado com menor temperatura, as células probióticas liofilizadas tiveram sua capacidade de produzir ou estimular enzimas digestivas afetada, sendo o resultado ainda pior com a bactéria probiótica Pdp13. A eficácia da aplicação dos probióticos depende de fatores como, a combinação das espécies, nível de aplicações, frequência de aplicações e condições ambientais (ZHOU; WANG; LI, 2009) e por isso, talvez, seja complexo avaliar diretamente os diferentes estudos utilizando probióticos (GOMEZ-GIL; ROQUE; TURNBULL, 2000).



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar a eficiência da suplementação dietética de bactéria probiótica amilolítica no desempenho e utilização do carboidrato pelo jundiá (*Rhamdia quelen*).

### Objetivos Específicos

Isolar, avaliar *in vitro* e identificar, a partir do intestino do jundiá, a cepa bacteriana amilolítica com potencial efeito probiótico.

Avaliar possível patogenicidade das cepa(s) amilolítica(s) isoladas ao jundiá, por meio de sinais clássicos.

Avaliar a composição bromatológica e análise do amido total da dieta experimental após suplementação da cepa probiótica.

Avaliar a digestibilidade do amido, fibras, proteína e matéria seca da dieta suplementada com a cepa probiótica para o jundiá.

Avaliar a atividade da enzima digestiva amilase da cepa probiótica.

Avaliar o desempenho zootécnico do jundiá alimentado com dieta suplementada com a cepa probiótica

Para atingir os objetivos propostos optou-se por dividir a presente tese em dois capítulos e/ou artigos, a saber:

Capítulo II – *Aeromonas veronii* como potencial probiótico para *Rhamdia quelen*.

Capítulo III – Suplementação de bactéria probiótica amilolítica na dieta do jundiá (*Rhamdia quelen*): efeito no crescimento, histologia intestinal e utilização de nutrientes.

Os artigos científicos que se seguem foram redigidos conforme as normas para submissão no periódico Letters in Applied Microbiology e Aquaculture Nutrition, respectivamente.



## CAPÍTULO II

### Artigo 1

***Aeromonas veronii* como potencial probiótico para *Rhamdia quelen*.**

(Preparado para submissão ao periódico *Letter in Applied Microbiology*)



## ***Aeromonas veronii* como potencial probiótico para *Rhamdia quelen***

Poletto, Tatiana Vieira<sup>1\*</sup>, Vieira, Cleide Rosana Werneck<sup>2</sup>, Silva, Carlos Peres<sup>3</sup> e Fracalossi, Débora Machado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aquicultura, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> UFSC, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup> UFSC, Departamento de Bioquímica, Florianópolis, SC, Brasil.

\*Autor correspondente: Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Telefone: +55 48 3721-6300.

Endereços de email: [tatipoletto@gmail.com](mailto:tatipoletto@gmail.com) (T.V. Poletto); [carlos.peres@ufsc.br](mailto:carlos.peres@ufsc.br) (C.P. Silva); [cleide.werneck@ufsc.br](mailto:cleide.werneck@ufsc.br) (C.R.W. Vieira); [debora.fracalossi@ufsc.br](mailto:debora.fracalossi@ufsc.br) (D.M. Fracalossi)

**Importância e impacto do estudo:** Este estudo fornece dados interessantes relacionados à futura utilização de bactérias probióticas amilolíticas, como a *Aeromonas veronii*, em dietas formuladas com maior conteúdo em carboidratos. Nossos resultados demonstraram o potencial da cepa isolada *A. veronii* para melhorar o processo de digestão do jundiá, por meio do fornecimento de enzimas exógenas. Tal utilização das bactérias probióticas representa forma interessante para reduzir custos e diminuir a dependência de ingredientes de origem animal, reforçando a sustentabilidade da aquicultura.

### **Resumo**

Este estudo objetivou isolar uma cepa de bactéria amilolítica potencialmente probiótica do intestino do jundiá (*Rhamdia quelen*), visando melhorar a digestibilidade de carboidratos em peixes. Duas de 31 cepas isoladas do intestino anterior do jundiá cresceram em ágar SA, sendo consideradas, portanto, amilolíticas. A cepa que apresentou o maior potencial amilolítico, baseado no tamanho do halo formado pela secreção de amilase, foi a escolhida. A cepa foi posteriormente caracterizada fenotipicamente e analisada para determinação da sua tolerância frente à bile e pH, além da análise quantitativa da atividade enzimática da amilase. A candidata probiótica, identificada como *Aeromonas veronii*, mostrou capacidade de sobreviver ao estresse de diversos níveis de pH e sais biliares, além de secretar interessante perfil enzimático. Os resultados demonstraram o potencial da *A. veronii* para melhorar o processo de digestão do jundiá fornecendo enzimas exógenas para a degradação e absorção dos nutrientes.

Palavras-chave: enzimas, probióticos, aquicultura, microbiologia intestinal, peixe (vivo)

## Introdução

A produção de rações para a aquicultura continua dependente de ingredientes caros, ricos em proteínas para atender às exigências nutricionais dos peixes (Glencross *et al.* 2007; Tacon e Metian 2008). As exigências nutricionais e a capacidade de utilizar diversos ingredientes variam de acordo com a fisiologia e morfologia intestinal dos peixes (Glencross; Booth; Allan, 2007; Krogdahl; Hemre; Mommsen, 2005), dificultando assim a busca por ingredientes alternativos, com menor custo.

O carboidrato é um macronutriente interessante que pode ser incluído em dietas formuladas como fonte de energia não proteica, representando maneira eficaz de diminuir custos e contribuir para o efeito poupador de proteína (Hemre *et al.* 2002; Gatlin III 2010). No entanto, não há indícios de exigência dietética específica de carboidratos para peixes (NRC 2011), além do que, peixes não utilizam de forma eficiente os carboidratos dietéticos, como os animais terrestres o fazem.

O jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard 1824) é uma espécie de peixe amplamente distribuída e de interesse para a aquicultura principalmente no sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Esta espécie é modelo para o estudo da utilização do carboidrato dietético, pois apesar do seu hábito alimentar onívoro, exhibe intestino curto, o que dificulta a utilização de carboidratos (Moro *et al.* 2010; Oliveira Filho; Fracalossi, 2006; Rodrigues *et al.*, 2012) em comparação com outros onívoros típicos como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Krogdahl; Hemre; Mommsen, 2005; Rodrigues *et al.* 2012).

As enzimas digestivas são a chave para promover a melhor eficiência alimentar nos peixes. A caracterização destas enzimas revela a capacidade digestiva para hidrolisar carboidratos, proteínas e lipídios na dieta consumida (Lemieux; Blier; Dutil, 1999).

As bactérias probióticas atuam diretamente nos processos digestivos e nutricionais de animais aquáticos (Ringø; Strom; Tabachek, 1995), através da produção de enzimas (Yanbo e Zirong 2006). Existe grande potencial para pesquisas ligadas à utilização destas bactérias produtoras de enzimas relacionadas com o aumento da eficiência alimentar e, conseqüentemente, maior crescimento do hospedeiro (Gatesoupe, 2002; Lara-Flores *et al.* 2003). Portanto, o objetivo deste estudo foi o isolamento de uma bactéria amilolítica potencialmente probiótica de uma espécie de peixe de água doce, o jundiá (*R. quelen*), para melhorar sua digestibilidade frente a utilização do carboidrato.

## **Materiais e métodos**

### *Isolamento*

Para esvaziar o trato gastrointestinal, 10 jundiás fêmeas foram deixados em jejum por 48 h ( $95,45 \pm 6,66$  g) antes da dissecação (Ray *et al.* 2010). Todos os peixes foram sacrificados por secção da medula espinhal e tiveram seus intestinos anteriores removidos assepticamente. Em seguida, os intestinos foram cortados em partes e lavados três vezes, utilizando uma seringa com solução refrigerada de cloreto de sódio 0,9% estéril. Os intestinos anteriores foram homogeneizados na solução refrigerada de NaCl 0-9% (Das e Tripathi 1991) em almofariz esterilizado. O manejo dos peixes seguiu o protocolo PP00815, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

### *Deteção de bactérias produtoras de amilase*

O homogeneizado intestinal foi utilizado após 10 diluições decimais em série. Alíquotas das diluições foram distribuídas em triplicata (100  $\mu$ L) em meio de cultivo agar triptona de soja (TSA) para caracterizar a contagem viável total de bactérias aeróbias autóctones. As placas foram incubadas a 32 °C por 24 h e as colônias selecionadas foram purificadas por estrias de esgotamento (Ray *et al.* 2010), transferidas para ágar de amido (SA) (Bairagi *et al.* 2002) e incubadas a 32 °C por 24 h. As cepas que cresceram nessas condições foram consideradas amilolíticas (Mondal *et al.* 2008).

### *Determinação de possíveis efeitos prejudiciais causados pelas cepas selecionadas ao hospedeiro*

Para verificar possíveis efeitos prejudiciais causados pelas cepas isoladas ao hospedeiro, 36 juvenis de jundiá ( $28,4 \pm 5,0$  g) foram estocados em cada um de três aquários de 50 L: dois aquários continham os peixes que seriam alimentados com as cepas candidatas a probiótico e outro, aqueles a serem alimentados com a dieta controle. Foi realizada troca diária de água (70%), fornecida aeração contínua e mantida temperatura constante (28 °C) por 120 h.

As duas cepas candidatas a probiótico foram cultivadas em meio de caldo triptona de soja (TSB) em incubadora orbital a 32 °C durante a noite. Após a incubação, as células foram centrifugadas (5 000 g, 5 min) e lavadas duas vezes em solução salina estéril e ressuspensas na mesma solução. Diluições seriadas e plaqueamentos foram utilizados

para verificar a relação entre a densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ) e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro. A absorbância a 600 nm foi ajustada para  $0,60 \pm 0,05$  para padronizar o número de bactérias ( $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>).

Todos os peixes foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 mL de solução salina contendo  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> da respectiva cepa selecionada, exceto para o grupo controle, que foi inoculado apenas com solução salina. Durante o experimento, o comportamento dos peixes foi monitorado e após 120 h, todos os peixes foram sacrificados conforme descrito acima e seus órgãos foram examinados para verificar quaisquer evidências de enfermidades. Para certificar sobre a presença das respectivas cepas isoladas nos tratamentos, foram coletados swabs da cavidade peritoneal e dos rins de todos os peixes, os quais foram inoculados em TSA e incubados a 32 °C por 24 h.

### *Caracterização fenotípica*

As cepas candidatas a probiótico foram cultivadas em TSA a 32 °C por 24 h e as seguintes características foram testadas: reação de Gram confirmada pelo método KOH, forma e motilidade (microscópio de contraste de fase), atividade de citocromo-oxidase, teste de catalase ( $H_2O_2$ , 3% v/v) e teste de oxidação/fermentação (O/F) da glicose.

### *Ensaio qualitativo da amilase*

As cepas isoladas foram inoculadas em placas de ágar SA e incubadas a 32 °C por 24 h. Após este período, a solução do iodo de Lugol [(w/v) 1% de iodo em iodeto de potássio 2%] foi derramada sobre as placas. A atividade enzimática extracelular da amilase foi detectada como uma zona clara (halo) ao redor das colônias, sendo seu diâmetro medido com paquímetro. A cepa candidata a probiótico, que apresentou o maior halo em torno de suas colônias, foi a selecionada para os próximos ensaios.

### *Identificação molecular*

Para extrair o DNA, a cepa selecionada foi cultivada em TSB a 32 °C por 24 h. O DNA genômico bacteriano foi isolado usando o Kit DNeasy® Tissue (QIAGEN, CA, USA). Sequências do gene 16S rDNA foram amplificadas utilizando *primers* universais do rDNA bacteriano 8F (5'-AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG-3'), 519R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'), 519F (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3') e 1492R (5'-GCYTACCTTGTTACGACTT-3'). A amplificação por PCR foi



realizada em um termociclador (2720, Applied Biosystems). A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 50 °C e a 1 min a 72 °C, com uma etapa da extensão final de 10 min a 72 °C. O DNA extraído (5 µL) foi utilizado para a amplificação em um volume total de 50 µL, contendo 1,25 U de AmpliTaq LD DNA polimerase (Applied Biosystems, CA, USA).

Após a purificação, os produtos PCR foram diretamente sequenciados pelo método de sequenciamento Sanger através do analisador genético ABI PRISM 350, utilizando-se o kit de sequenciamento ABI BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

A sequência de DNA obtida foi comparada com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o programa BLAST. Uma análise filogenética foi realizada utilizando o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v4.0.

### *Ensaio quantitativo da amilase*

A cepa candidata a probiótico selecionada foi cultivada em 25 mL em meio TSB *overnight* a 32 °C. Uma alíquota de 0,5 mL da cultura líquida produzida foi posteriormente inoculada em um frasco com meio de cultivo "caldo" SA, consistindo do meio ágar SA sem a adição do ágar (Bairagi *et al.* 2002; Mondal *et al.* 2008; Ray *et al.* 2010). O frasco da cultura foi incubado a 32 °C por 24 h. As células foram então descartadas após centrifugação (10 000 g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante, utilizado como extrato enzimático, foi dividido em alíquotas, disposto em tubos de Eppendorf de 15 mL e armazenado a -80 °C até ser analisado.

A atividade da amilase foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Noelting e Bernfeld 1948). A mistura da reação consistiu em 25 µL de uma solução de amido 1% (p/v) como substrato, 25 µL de tampão Tris-HCl [50 mmol, pH 8,5] e 50 µL da amostra de extrato enzimático. A mistura de reação foi diluída em água destilada e a absorbância lida a 550 nm utilizando-se leitor de microplacas (Tecan 200 infinito). Este método baseia-se na estimativa de açúcar redutores utilizando a maltose como padrão. A atividade enzimática quantitativa foi expressa em unidades (U). Uma unidade da amilase foi definida como a quantidade de enzima mL<sup>-1</sup> capaz de liberar 1 µg de açúcar redutor por minuto. A determinação de proteína total foi realizada segundo Bradford (1976), utilizando-se a albumina bovina sérica como padrão. A atividade específica foi definida em termos de unidades da atividade enzimática por mg de proteína total.

### *Caracterização enzimática*

A caracterização enzimática da cepa potencialmente probiótica foi realizada utilizando o sistema API ZYM (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França), de acordo com as instruções do fabricante.

### *Tolerância frente a diferentes pH e bile*

A candidata a probiótico selecionada foi cultivada anteriormente em meio TSB durante a noite a 32 °C. A absorbância ( $A_{600\text{ nm}}$ ) foi ajustada como  $0,25 \pm 0,05$  para padronizar a concentração bacteriana ( $10^6$  a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>). Aliquotas da suspensão bacteriana foram centrifugadas (5 000 g, 10 min) e ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) estéril, que foi ajustado para os níveis de pH (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) usando 1% HCl ou NaOH. As amostras foram então incubadas durante 2 h a 32 °C. Após o período de incubação, a  $DO_{600}$  foi lida e as amostras foram diluídas serialmente em PBS estéril para verificar as contagens viáveis em placas de TSA.

Já a tolerância frente as duas concentrações de bile foi determinada utilizando uma suspensão inicial ( $10^6$  a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) da cepa selecionada crescida no meio TSB. Aliquotas da suspensão bacteriana foram centrifugadas (5 000 g, 10 min) e em seguida ressuspensas em PBS estéril com 0, 0,15 ou 0,3% (p/v) bile bovina. As amostras foram posteriormente incubadas durante 2, 4 e 8 h a 32 °C. Após cada período de incubação, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro Gênesis 10S (Thermo Scientific, MA, EUA) em 600 nm e as amostras foram diluídas serialmente em PBS estéril para verificar as contagens viáveis através da contagem em placa de TSA.

Todos os experimentos in vitro foram executados em triplicata.

## **Resultados e discussão**

Das 31 cepas isoladas em ágar triptona de soja (TSA) a partir do intestino anterior de jundiás apenas duas cresceram (6,4% do total) em ágar amido (ágar SA) e, portanto, foram consideradas amilolíticas. Não foi observada nenhuma mortalidade, evidências de quaisquer efeitos prejudiciais ou sinais de doenças ocasionadas por qualquer uma das cepas selecionadas (designadas como M2 e E7 até a identificação correta) nos juvenis de jundiá, após o desafio com a *A. veronii* inoculada intraperitonealmente nos peixes testados. A cepa M2 foi caracterizada como bactéria Gram-negativa, móvel, forma de bastonetes, não fermentadora da glicose, catalase e oxidase positiva. Já a cepa isolada

E7, foi caracterizada como bastonetes Gram-negativa, móvel, fermentadora da glicose, catalase e oxidase positivas.

A intensidade de produção de enzimas extracelulares amilolíticas pelas duas cepas isoladas anteriormente foi avaliada por meio de ensaio qualitativo, sendo que a formação de halo expressa pela cepa E7 alcançou 4 mm, comparada com o halo de 0,5 mm pela cepa M2. Considerando este resultado, apenas a cepa E7 foi mantida, por apresentar o melhor resultado qualitativo relacionado à produção de enzimas amilolíticas. Com base na análise de sequências do gene 16S rDNA, a cepa E7 selecionada foi identificada como *Aeromonas veronii*, com homologia de 99%.

Talvez o critério mais importante para a seleção de um potencial probiótico seja a capacidade da bactéria de colonizar o intestino do hospedeiro (Merrifield *et al.* 2010; Nayak 2010). Portanto, o isolamento da cepa a partir do trato gastrointestinal do hospedeiro é adequado para selecionar um probionte, já que considera a adaptação que permite sua fixação aos tecidos intestinais (Carnevali *et al.* 2004). Este procedimento não restringe o potencial de um probionte ao de uma cepa transitória (O'Sullivan 2001), apesar de que uma cepa transitória também pode influenciar positivamente o hospedeiro (Isolauri e Ouwehand 2004).

A cepa candidata a probiótico isolada neste estudo provavelmente pertence à microbiota autóctone, já que nenhum dos dois procedimentos anteriores realizados para garantir a remoção das bactérias alóctones prejudicaram a capacidade da cepa em permanecer aderida ao intestino jundiá. Um estudo identificou a elevada habilidade da *A. veronii* quando em contato com o intestino da carpa sob condição de alimentação ou jejum, o qual resultou em representatividade bacteriana da *A. veronii* de 50% em ambos os grupos, em contraste com outros isolados (Namba *et al.* 2007). Esta evidência corrobora a hipótese da colonização do intestino do jundiá pela *A. veronii* no presente estudo.

O gênero *Aeromonas* é amplamente descrito como patógeno emergente em organismos aquáticos e seres humanos (Janda e Abbott 2010), mas ainda há um elo perdido entre este gene virulento e uma determinada espécie ou origem. Esta situação se torna mais evidente quando espécie é capaz de apresentar vários fatores de virulência sem mostrar potencial de virulência definitivo (Martino *et al.* 2014). A utilização de uma bactéria, pertencente a este gênero excepcionalmente diversificado, como probiótico pode ter efeitos positivos, já que cepas probióticas competem de forma eficaz com outras bactérias. É importante notar que seria altamente desejável obter cepas probióticas

da mesma espécie das patogênicas que procuram por nutrientes e espaço para se fixar no intestino do hospedeiro (Gram e Ringø 2005). No presente estudo, *A. veronii* não apresentou qualquer efeito nocivo ao jundiá, propiciando a base para uma relação mutualista (Ray *et al.* 2012). Além disso, a alta variabilidade nucleotídica apresentada (Alperi *et al.* 2010a; Alperi *et al.* 2010b) e a falta de consenso estabelecida sobre a patogenicidade do gênero *Aeromonas* em humanos (Janda e Abbott 2010) deixa lacunas a serem preenchidas, permitindo o uso de tais cepas como possível probióntes.

Neste estudo, *A. veronii* apresentou atividade da enzima amilase de  $28,57 \text{ U ml}^{-1}$ , sendo a atividade específica  $3,57 \text{ U mg}^{-1}$ . Além disso, o perfil enzimático da candidata a probiótico foi determinado usando o sistema API ZYM (Tabela 2). O sistema API ZYM é um ensaio semi-quantitativo para a análise de 19 enzimas hidrolíticas, sendo destas, oito carboidrases. No entanto, dentre as carboidrases, apenas N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase apresentou atividade positiva para *A. veronii* no presente estudo. Todas as outras carboidrases apresentaram atividade negativa, incluindo  $\alpha$ -glicosidase, o que diminui a variedade de carboidratos suscetíveis que permitiriam completa degradação por esta enzima exógena para utilizar na alimentação da aquicultura, já que a  $\alpha$ -glicosidase é apta a hidrolisar muitos carboidratos, tais como a  $\alpha$ -D-glicosídeos ( $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo e metil- $\alpha$ -D-glicosídeo), oligossacarídeos (maltodextrina) e polissacarídeos (amilose, amilopectina e glicogênio) (Sun e Henson 1990). Por outro lado, o próprio hospedeiro pode secretar a enzima  $\alpha$ -glicosidase evitando, assim, a limitação imposta pela *A. veronii*. Esta hipótese é suportada pelo fato de que a digestão do jundiá melhora pela inclusão na dieta de ingredientes de fontes vegetais com níveis mais elevados de maltose, em vez de amido (Gominho-Rosa *et al.* 2015). Além disso, o promissor efeito sinérgico da combinação entre  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase resultou na hidrólise de grânulo de amido, que foi de 8 a 11 vezes maior que a soma da hidrólise alcançada por duas enzimas utilizadas separadamente (Sun e Henson 1990).

**Tabela 2** Perfil enzimático (API ZYM test) da candidata a probiótico *Aeromonas veronii*

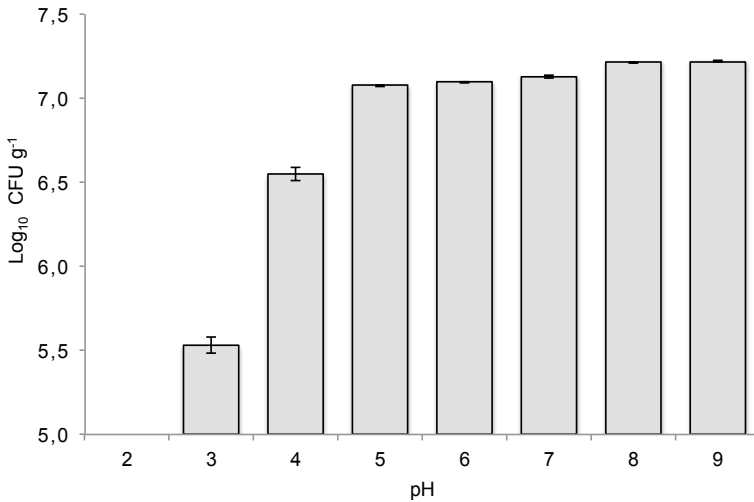
| Teste bioquímico            | <i>A. veronii</i> |
|-----------------------------|-------------------|
| Fosfatase alcalina          | -                 |
| Esterase (C4)               | +                 |
| Esterase lipase (C8)        | +                 |
| Lipase (C4)                 | -                 |
| Leucine arilamidase         | +                 |
| Valina arilamidase          | -                 |
| Cistina arilamidase         | -                 |
| Tripsina                    | -                 |
| $\alpha$ -quimotripsina     | +                 |
| Fosfatase ácida             | +                 |
| Naftol-AS-BI-fosfohidrolase | +                 |
| $\alpha$ -Galactosidase     | -                 |
| $\beta$ -Galactosidase      | -                 |
| $\beta$ -Glucuronidase      | -                 |
| $\alpha$ -Glucosidase       | -                 |
| $\beta$ -Glucosidase        | -                 |
| N-acetil-b-glucosaminidase  | +                 |
| $\alpha$ -Manosidase        | -                 |
| $\alpha$ -Fucosidase        | -                 |

No presente estudo, a cepa selecionada apresentou alta tolerância às condições ácidas (Fig. 1). A resistência da cepa isolada foi observada após exposição ao meio acidificado, exceto para o pH 2. No entanto, a maior tolerância da *A. veronii* ocorreu entre os valores de pH 5 e 9. A tolerância da *A. veronii* na presença de sais biliares também foi analisada e os resultados mostraram que ela foi capaz de sobreviver em ambas as concentrações testadas (0,15 e 0,3%) (Fig. 2). Os resultados deste estudo mostraram que *A. veronii* apresenta tolerância a pH e sais biliares, iniciando pela exposição a um pH de 3 e em todas as concentrações testadas de sais biliares (0,15% - 0,3%).

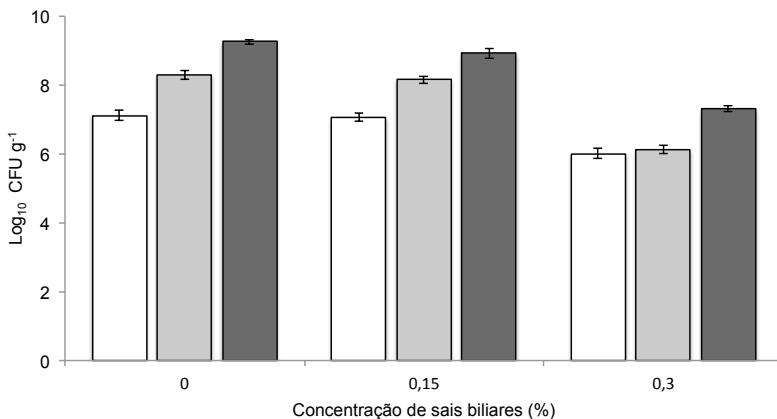
Apesar da importância atribuída à sobrevivência gástrica às cepas probióticas, estudos mostram que é possível alcançar a viabilidade de cepas ácido-sensíveis no estômago através da indução da elevação

do pH pela adição de alimentos (Conway *et al.* 1987) ou por meio da oferta de mecanismos de proteção física para os microrganismos (Huang e Adams 2004).

Neste contexto, um critério essencial para a seleção de probióticos, além da tolerância a sais biliares (O'Sullivan 2001; Balcázar *et al.* 2008), deve ser a capacidade de tolerar um pH alcalino (Huang e Adams 2004), perto de 8,5 que ocorre na região posterior do piloro (Deguara *et al.* 2003), assim permitindo a sobrevivência do probionte e a colonização do intestino delgado. De acordo com este cenário, o presente estudo mostrou resultados promissores, já que a *A. veronii* tolerou níveis de pH variando de neutro até pH 9, que foi o nível máximo testado neste estudo.



**Figura 1.** Tolerância da *Aeromonas veronii* a diferentes níveis de pH após 2 h de incubação em TSB. Resultados estão expressos em Log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> da sobrevivência da bactéria em diferentes pHs (médias ± SE).



**Figura 2.** Tolerância da *Aeromonas veronii* a sais biliares após 2 h (□), 4 h (■) e 8 h (■) de incubação em TSB. Resultados estão expressos em Log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> da sobrevivência da bactéria em diferentes concentrações de bile (médias ± SE).

Concluindo, os resultados deste estudo demonstraram o potencial da cepa isolada *A. veronii* para melhorar o processo de digestão do jundiá, fornecendo enzimas exógenas para a degradação e absorção dos nutrientes. A bactéria isolada do trato intestinal do jundiá foi capaz de produzir enzimas que são comumente usadas no processo de digestão, incluindo fosfatase, lipase, esterase, peptidase e carboidrase. Outra característica favorável da *A. veronii* é sua capacidade de sobreviver à pressão exercida por diferentes níveis de pH e sais biliares.

### Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Agência Federal Brasileira pelo suporte e avaliação de pós-graduação (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fornecer bolsas para o primeiro e último autor, respectivamente.

### Conflito de interesses

Os autores deste manuscrito certificam que não há conflitos de interesse a divulgar.

## Referências

AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 112–129, 2001.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938–956, 2014.

ASP, N. G. Dietary carbohydrates: Classification by chemistry and physiology. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 9–14, 1996.

AZAZA, M. S. et al. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. **Aquaculture Research**, p. 14–27, 2013.

BAGHERI, T. et al. Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 43–48, 2008.

BAIRAGI, A. et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, p. 109–121, 2002.

BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173–186, 31 maio 2006.

BARRON, C. et al. Microscopical Study of the Destructuring of Waxy Maize and Smooth Pea Starches by Shear and Heat at Low Hydration. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 289–300, 2001.

BERGOT, F.; BREQUE, J. DIGESTIBILITY OF STARCH BY RAINBOW TROUT: EFFECTS OF THE PHYSICAL STATE OF STARCH AND OF THE INTAKE LEVEL. **Aquaculture**, v. 34, p. 203–212, 1983.

BOMBA, A. et al. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 121–126, 2002.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba, fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 183–191, 2006.

BUTS, J. P. et al. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation



after proximal enterectomy in rats. **Gut**, v. 45, n. 1, p. 89–96, jul. 1999.

CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 109, n. 2, p. 213–222, 1994.

CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 431–437, 1995.

CALHAU, C. et al. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. **Clinical biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 571–7, out. 2000.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. et al. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.

CARNEVALI, O. et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 430–438, 2006.

CASTILLO, S.; GATLIN, D. M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. **Aquaculture**, v. 435, p. 286–292, jan. 2015.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial microbes**, v. 1, n. 1, p. 3–9, mar. 2010.

CHENG, Z. J.; HARDY, R. W. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 2003.

CUVIER-PÉRES, A.; KESTEMONT, P. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 279–285, 2001.

DEUTSCH, L. et al. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. **Global Environmental Change**, v. 17, n. 2, p. 238–249, 2007.

DOUILLET, P.; LANGDON, C. J. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. **Biological Bulletin**, v. 184, n. 1, p. 36, fev. 1993.

DREW, M. D.; BORGESON, T. L.; THIESSEN, D. L. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, n. 2, p. 118–136, 2007.

EL-HAROUN, E. R.; GODA, A. M. A S.; KABIR CHOWDHURY, M. A. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473–1480, 2006.

ERFANULLAH; JAFRI, A. K. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). **Aquaculture**, v. 161, n. 1-4, p. 159–168, 1998.

FRACALOSSO, D. M.; ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S. **No rastro das espécies nativasPanorâma da Aquicultura**, 2002.

FURNE, M. et al. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 149, n. 4, p. 420–425, 2008.

GANGULY, S. et al. Supplementation of prebiotics in fish feed: A review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 195–199, 2013.

GARCÍA DE LA BANDA, I. et al. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 281–288, ago. 2010.

GARCÍA-ALONSO, A. et al. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 181–187, 1999.

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

GATESOUBE, F. J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. **Aquaculture**, v. 212, n. 1-4, p. 347–360, 2002.

GATLIN, D. M. et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 6, p. 551–579, 2007.

GATLIN III, D. M. Principles of Fish Nutrition. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 5003, p. 1–8, 2010.

GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of

Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, n. 3-4, p. 303–314, 2000.

GERMAN, D. P. et al. Digestive enzyme Activities in Herbivorous and Carnivorous Prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 5, p. 789–804, 2004.

GLENCROSS, B. D.; BOOTH, M.; ALLAN, G. L. A feed is only as good as its ingredients? a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 17–34, fev. 2007.

GÓMEZ, R. G. D.; SHEN, M. A. Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 2, p. 215–218, 23 maio 2008.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 259–270, nov. 2000.

GOMINHO-ROSA, M. D. C. et al. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p. 92–99, jan. 2015.

GOUVEIA, A.; DAVIES, S. J. Modulation of the Post-Prandial Plasma Glucose Profile in Juvenile European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* Fed Diets Varying in Starch Complexity. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 35, n. 3, p. 392–400, 2004.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175–194, set. 2002.

HUNG, L. T. et al. Comparison of starch utilization in fingerlings of two Asian catfishes from the Mekong River (*Pangasius bocourti* Sauvage, 1880, *Pangasius hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 215–222, 2003.

IRIANTO, A; AUSTIN, B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 59–62, 2003.

KAR, N.; GHOSH, K. Enzyme Producing Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 115–120, 2008.

KAUSHIK, S. J. et al. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*: I. Utilization of digestible carbohydrates by sturgeon. *Aquaculture*, v. 76, n. 1-2, p. 9. **Aquaculture**, v. 76, n. 1-2, p. 97–107, 1989.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1–14, jan. 2008.

KIESSLING, A.; ASKBRANDT, S. Nutritive value of two bacterial strains of single-cell protein for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 109, n. 2, p. 119–130, 1993.

KIM, J. D.; KAUSHIK, S. J. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 106, p. 161–169, 1992.

KOLOUCH, J. F. The lymphocyte in acute inflammation. **The American journal of pathology**, v. 15, n. 4, p. 413–428, 1939.

KRAMER, D. L.; BRYANT, M. J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet - the long and short of a convoluted issue. **Environmental Biology of Fishes**, v. 42, n. 2, p. 129–141, 1995.

KRAUGERUD, O. F. et al. Nutrient digestibilities and gut function in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. **Aquaculture**, v. 273, n. 1, p. 96–107, 2007.

KROGDAHL, Å.; HEMRE, G.; MOMMSEN, T. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 103–122, 2005.

KUHN, D. D. et al. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, n. 1-2, p. 51–57, 2009.

KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. **Aquaculture**, v. 148, n. 1, p. 25–37, 1996.

LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 193–201, fev. 2003.

LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J. D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the

- Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 293–303, 1999.
- LI, X. F. et al. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 701–708, 2013.
- LOBO, C. et al. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 295–309, fev. 2014.
- LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, n. 3, p. 331–339, 2004.
- MAZUR, A. K.; NAKATANI, H. **Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of amylose and amylopectin.** **Archives of biochemistry and biophysics**, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8215418>>
- MCCLEARY, B. V.; GIBSON, T. S.; MUGFORD, D. C. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 3, p. 571–579, 1997.
- MELO, J. F. B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**, 2004.
- MERRIFIELD, D. L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1–18, abr. 2010.
- MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundiá fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 331–343, 2004.
- MOHAPATRA, S. et al. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 27 fev. 2012.
- MONDAL, S. et al. Distribution of enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. **Acta Ichthyologica Et Piscatoria**,

v. 38, n. 1, p. 1–8, 24 jun. 2008.

MONDAL, S.; ROY, T.; RAY, A. K. **Characterization and Identification of Enzyme-producing Bacteria Isolated from the Digestive Tract of Bata, Labeo bata.** [s.l.: s.n.]. v. 41

MONTES-GIRAO, P. J.; FRACALOSSO, D. M. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 4, p. 388–396, 2006.

MORO, G. V. et al. Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 394–400, fev. 2010.

NAMBA, A.; MANO, N.; HIROSE, H. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1307–1317, maio 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Nutrient requirements of fish and shrimp.** Whashington, D.C.: National Academies Press, 2011.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553–1573, 2010.

OCHOA-SOLANO, J. L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food microbiology**, v. 23, n. 6, p. 519–25, out. 2006.

OLIVA-TELES, A.; GONCALVES, P. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccaromyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 202 (3-4), p. 269–278, 2001.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C. DE; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1581–1587, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C. DE; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1581–1587, 2006.

OTTERÅ, H. et al. Feed preferences in juvenile cod estimated by inert lanthanid markers - effects of moisture content in the feed. **Aquaculture International**, v. 11, n. 1-2, p. 217–224, 2003.

PAGE, A. R.; GOOD, R. A. A clinical and experimental study of the

function of neutrophils in the inflammatory response. **The American journal of pathology**, v. 34, n. 4, p. 645–69, 1958.

PANIGRAHI, A. et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, n. 4, p. 379–388, 2004.

PANSERAT, S. et al. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 2, p. 275–283, 2001.

PEDROTTI, F. S. et al. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 472–481, 2013.

PÉRES, A. et al. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 237–242, 1996.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 205, n. 3-4, p. 287–299, 2002.

RAY, A. K. et al. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. **Aquaculture Research**, p. 1462–1469, dez. 2010.

RAY, A. K.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465–492, 20 out. 2012.

RIBEIRO, L.; CAHU, C.; DINIS, M. T. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and. n. Dabrowski 1984, p. 61–69, 2002.

RINGØ, E.; BIRKBECK, T. H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, n. 2, p. 73–93, 1999.

RINGØ, E.; STROM, E.; TABACHEK, J. Intestinal microflora of salmonids : a review. **Aquaculture Research**, v. 26, p. 773–789, 1995.

RODRIGUES, A. P. O. et al. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 65–72, 29 fev. 2012.

RODRIGUEZ-ESTRADA, U. et al. Effects of Inactivated *Enterococcus faecalis* and Mannan Oligosaccharide and Their Combination on Growth, Immunity, and Disease Protection in Rainbow Trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 75, n. 3, p. 416–428, jul. 2013.

SÁENZ DE RODRIGÁÑEZ, M. A. et al. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 177–185, abr. 2009.

SARGENT, J. R.; TACON, A. G. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 2, p. 377–383, 1999.

SCHRIJVER, R. DE; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* / and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, v. 186, p. 107–116, 2000.

SINGH, R. K.; BALANGE, A. K.; GHUGHUSKAR, M. M. Protein sparing effect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 680–684, 2006.

SJOFJAN, O.; ARDYATI, T. Extracellular amylase activity of amylolytic bacteria isolated from quail's (*Coturnix japonica*) intestinal tract in corn flour medium. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 5, p. 411–415, 2011.

SLAWSKI, H. et al. Total fish meal replacement with canola protein isolate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 535–542, 2013.

SONG, Z. et al. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n. 7, p. 596–602, 2006.

STEFFENS, W. Protein utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*): A brief review. **Aquaculture**, v. 23, n. 1-4, p. 337–345, 1981.

STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 109–121, jan. 2003.

SUGITA, H.; KAWASAKI, J.; DEGUCHI, Y. Production of amylase by



the intestinal microflora in cultured freshwater fish. **Letters in applied microbiology**, v. 24, n. 2, p. 105–108, 1997.

SUN, Y.-Z. et al. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. e733–e740, 13 jun. 2011.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, n. 1-4, p. 146–158, dez. 2008.

TAOKA, Y. et al. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 4, p. 755–766, 2006.

TENGJAROENKUL, B. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, n. 3-4, p. 317–327, 2000.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1-2, p. 1–27, 2007.

UGOLEV, A. M.; KUZ'MINA, V. V. Fish enterocyte hydrolases. Nutrition adaptations. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 107, n. 1, p. 187–193, 1994.

VENOU, B. et al. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 225, n. 1-4, p. 207–223, 2003.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 64, n. 4, p. 655–71, dez. 2000.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; VIEILLE, C. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VINE, N. G. et al. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 6, p. 319–326, 2004.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 404–27, maio

2006.

WACHÉ, Y. et al. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 470–478, ago. 2006.

WALTON, M. J.; COWEY, C. B. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 59–79, 1982.

WANG, Y. et al. Optimizing dietary protein sources for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with an emphasis on using poultry by-product meal to substitute fish meal. **Aquaculture Research**, p. 874–883, 2013.

WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. **Aquaculture**, v. 281, p. 1–4, 2008.

WANG, Y.-B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 259–264, set. 2007.

WATANABE, T. Strategies for further development of aquatic feeds. **Fisheries Science**, v. 68, n. 2, p. 242–252, 2002.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 67–80, jul. 1994.

YANBO, W.; ZIRONG, X. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 3-4, p. 283–292, abr. 2006.

YUN, B. et al. Fishmeal can be totally replaced by plant protein blend at two protein levels in diets of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 69–78, 2014.

ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3-4, p. 349–353, fev. 2009.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516–524, 2006.

## CAPÍTULO II

### Artigo 2

**Suplementação de bactéria probiótica amilolítica na dieta do jundiá (*Rhamdia quelen*): efeito no crescimento, histologia intestinal e utilização de nutrientes**

(Preparado para submissão ao periódico *Aquaculture Nutrition*)



## Suplementação de bactéria probiótica amilolítica na dieta do jundiá (*Rhamdia quelen*): efeito no crescimento, histologia intestinal e utilização de nutrientes

Tatiana Vieira Poletto<sup>1</sup>, Eduardo Carginin Ferreira<sup>2</sup>, Débora Machado Fracalossi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aquicultura, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Laboratório de Marcadores Histológicos, Garopaba, SC, Brasil.

\*Autor correspondente: Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Tel./fax: +55 48 3721-6300.

Endereços de email: [tatipoletto@gmail.com](mailto:tatipoletto@gmail.com) (T.V. Poletto); [eduardo.carginin@ifsc.edu.br](mailto:eduardo.carginin@ifsc.edu.br) (E.C. Ferreira);

[debora.fracalossi@ufsc.br](mailto:debora.fracalossi@ufsc.br) (D.M. Fracalossi)

### Resumo

Peixes onívoros não utilizam bem o carboidrato da dieta, quando comparados com outros onívoros terrestres como o frango e o suíno. A utilização da bactéria amilolítica *Aeromonas veronii* como suplemento probiótico na dieta foi analisada com relação ao crescimento, digestibilidade de nutrientes e histologia do intestino do jundiá (*Rhamdia quelen*), peixe onívoro, com intestino curto. No ensaio de digestibilidade, os peixes (425,6 ± 159,94 g) foram alimentados em triplicata com dieta suplementada ou não com 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. veronii* por 100 g<sup>-1</sup> de dieta, por 79 dias. Foi utilizado o marcador inerte óxido de ítrio nas dietas experimentais, sendo que as fezes foram coletadas por sedimentação e os intestinos coletados para análise histológica. O coeficiente de digestibilidade aparente e nutriente digestível para fibra alimentar total foram maiores ( $P < 0,05$ ) nos peixes que receberam a dieta controle, mas não houve efeito na digestibilidade do amido. Não foram observadas alterações histológicas intestinais significativas com a suplementação da bactéria probiótica. O crescimento dos peixes foi avaliado em outro ensaio, sendo que os peixes (26,19 ± 0,32 g) foram alimentados com as mesmas dietas do ensaio de digestibilidade, por 45 dias. O peso final e ganho em peso foram maiores nos peixes alimentados com a dieta controle, sem probiótico. Apesar da suplementação dietética com a bactéria amilolítica não melhorar a digestibilidade do amido na dieta, há indícios de que a *A. veronii* degrade o amido e este fique mais disponível para o jundiá aproveitá-lo, porém, esta espécie de peixe não consegue utilizar de forma eficiente este carboidrato disponibilizado pela bactéria.

**Palavras-chave:** carboidrato, amilose, *A. veronii*, aeromonas, digestibilidade, desempenho zootécnico, jundiá.

## Introdução

Os peixes, ao contrário dos animais terrestres utilizam, geralmente, os carboidratos com menor habilidade. Esta eficiência varia entre as espécies onívoras, mais aptas, provavelmente pela diferenças funcionais e anatômicas do trato digestório e órgãos associados, em relação às espécies carnívoras, menos aptas (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; RODRIGUES et al., 2012).

Peixes não apresentam exigência nutricional para carboidratos (NRC, 2011), mas sua inclusão na dieta, pode diminuir seu custo, considerando-se que os sub-produtos de grãos, ricos em carboidratos, são fontes de energia não-proteica altamente disponíveis para alimentação animal. Caso a energia não-proteica seja insuficiente na dieta, ocorrerá a utilização da proteína como fonte de energia para fins de crescimento (WILSON, 1994), o que aumenta o custo da dieta e pode deteriorar a qualidade da água pelo incremento na excreção de produtos nitrogenados. A introdução de níveis apropriados de fontes de energia não-proteica determinam a eficiência da utilização da proteína disponibilizada pela dieta (STEFFENS, 1981). Por outro lado, quando carboidratos são adicionados à dieta em quantidade excessiva, podem resultar em sobrecarga metabólica (GOMINHO-ROSA et al., 2015; HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002; MORO et al., 2010).

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), é um bagre neotropical de interesse para a aquicultura, principalmente no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai pelas suas qualidades zootécnicas, aceitação no mercado consumidor e satisfatórias taxas de crescimento, inclusive durante o inverno, mais rigoroso no sul do Brasil. Ainda que o jundiá seja classificado como onívoro a partir da análise do conteúdo estomacal de exemplares selvagens (KRAMER; BRYANT, 1995), estudos realizados em nosso laboratório indicam que a espécie possui limitada capacidade de aproveitamento de ingredientes energéticos ricos em amido (GOMINHO-ROSA et al., 2015; MORO et al., 2010; OLIVEIRA-FILHO; FRACALOSSO, 2006; RODRIGUES et al., 2012), principalmente quando comparado à eficiência de utilização de onívoros típicos como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (GOMINHO-ROSA et al., 2015; KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; OLIVEIRA-FILHO; FRACALOSSO, 2006; RODRIGUES et al., 2012). A morfologia do trato digestório do jundiá, que apresenta intestino relativamente curto e falta de cecos pilóricos, sugere que a dieta desta espécie poderia ser formulada com ingredientes mais concentrados nutricionalmente, mas também revela o potencial do jundiá como

modelo para o estudo da utilização de carboidratos disponibilizados pela dieta.

A grande maioria dos estudos que selecionam potenciais microrganismos probióticos, focam na sanidade. Porém um importante efeito da utilização dos probióticos, que ainda não é extensivamente estudado, mas demonstra importante potencial para a aquicultura, é a melhora da eficiência alimentar e do crescimento de organismos aquáticos dada pela suplementação desses microrganismos benéficos (CARNEVALI et al., 2006; GATESOUBE, 2002; LARA-FLORES et al., 2003; LOBO et al., 2014). As enzimas digestivas são um dos mais importantes fatores a influenciar a eficiência da utilização do alimento nos peixes e a caracterização dessas enzimas ditam a capacidade digestiva do peixe em hidrolisar carboidratos, proteínas e lipídios dos alimentos ingeridos (LEMIEUX; BLIER; DUTIL, 1999). Adicionalmente, a relação das enzimas digestivas com os microrganismos presentes no trato gastrointestinal dos organismos aquáticos tem um importante papel no processo digestivo pelo aumento da atividade da enzima total do intestino (ZIAEI-NEJAD et al., 2006) e estímulo da produção de enzimas endógenas (OCHOA-SOLANO; OLMOS-SOTO, 2006; WANG, 2007), o que ocasiona o aumento da digestibilidade do alimento. Entretanto, o conhecimento sobre as enzimas extracelulares produzidas pelas bactérias intestinais e sua significância bioquímica ainda é limitado (BAIRAGI et al., 2002).

Em estudo prévio (capítulo II desta tese), a bactéria *Aeromonas veronii* foi isolada do intestino de jundiás e selecionada pelo seu potencial amilolítico. O presente estudo foi planejado para avaliar o efeito desta bactéria, quando suplementada na dieta, na digestibilidade do amido e outros nutrientes, desempenho zootécnico e histologia intestinal do jundiá.

## **Materiais e métodos**

### *Dieta experimental*

A dieta experimental (Tabela 3) foi formulada para atender às exigências proteica, energética e de lisina, definidas para o jundiá (MEYER; FRACALOSI, 2004; MONTES-GIRAO; FRACALOSI, 2006). Para os demais nutrientes, a dieta visou atender às exigências nutricionais estabelecidas para o também onívoro bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (WEBSTER; LIM, 2002).

**Tabela 3** Composição percentual e proximal da dieta experimental (base seca).

| Ingredientes                            | g kg <sup>-1</sup> |
|---|--------------------|
| Milho                                   | 330,0              |
| Concentrado proteico de soja            | 320,0              |
| Farinha de vísceras de aves             | 171,0              |
| Farinha de resíduo de salmão            | 71,5               |
| Óleo de fígado de bacalhau <sup>a</sup> | 17,0               |
| Óleo de soja                            | 15,0               |
| Premix vitamínico-mineral <sup>b</sup>  | 20,0               |
| Premix macromineral <sup>c</sup>        | 55,0               |
| Butilhidroxitolueno (BHT) <sup>d</sup>  | 0,3                |
| Óxido de ítrio <sup>e</sup>             | 1,0                |
| Composição proximal, g kg <sup>-1</sup> |                    |
| Matéria seca                            | 918,1              |
| Proteína bruta                          | 416,2              |
| Energia bruta <sup>f</sup>              | 17,3               |
| Extrato etéreo                          | 86,55              |
| Cinzas                                  | 129,65             |
| Fibra bruta                             | 139,8              |
| Amido <sup>g</sup>                      | 195,5              |
| Óxido de ítrio                          | 0,08               |

<sup>a</sup> Delaware Ltda. (Porto Alegre, RS, Brasil).

<sup>b</sup> Premix micro mineral vitamínico: Nutron Alimentos (Toledo, PR, Brasil), composição kg<sup>-1</sup> de produto: ácido fólico 250 mg, ácido pantotênico 5.000 mg, antioxidante 0,6 g, biotina 125 mg, cobalto 25 mg, cobre 2.000 mg, colina 75.000 mg, ferro 13.820 mg, iodo 100 mg, manganês 3.750 mg, niacina 5000 mg, selênio 75 mg, vitamina (vit.) A 1.000.000 UI, vit. B<sub>1</sub> 1250 mg, vit. B<sub>12</sub> 3.750 mg, vit. B<sub>2</sub> 2.500 mg, vit. B<sub>6</sub> 1.785 mg, vit. C 42.000 mg, vit. D<sub>3</sub> 500.000 UI, vit. E 20.000 UI, vit. K 35.000 mg, zinco 17.500 mg.

<sup>c</sup> Composição kg<sup>-1</sup>: fosfato bicálcico 130 g, cloreto de potássio 120 g, cloreto de sódio 130 g, sulfato de magnésio 620 g.

<sup>d</sup> Rhoster Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

<sup>e</sup> 99,99% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Omitido no preparo da dieta experimental para o ensaio de crescimento.

<sup>f</sup> Energia bruta (em kJ g<sup>-1</sup>)

<sup>g</sup> Método enzimático (MCCLEARY; GIBSON; MUGFORD, 1997)

Os ingredientes foram moídos (500 µm) e a mistura homogeneizada em misturador em “Y”, sendo posteriormente



adicionados os óleos e a água a 25% do peso seco. A mistura foi extrusada a 99-120 °C, em extrusora de rosca simples, com matriz de 4 mm, e seca em estufa de recirculação forçada de ar (55 °C) por 12 h. Posteriormente, a dieta foi acondicionada em sacos plásticos e armazenadas a -20 °C até a utilização.

#### *Bactéria probiótica e suplementação do inóculo à dieta*

A bactéria amilolítica *Aeromonas veronii* foi isolada do intestino do jundiá e confirmada como potencialmente probiótica previamente (capítulo II desta tese). *A. veronii* foi mantida em ágar triptona de soja (TSA; Himedia, Mumbai, Índia) a 32 °C por 24 h, sendo posteriormente inoculada em caldo triptona de soja (TSB; Himedia) e incubada sob agitação em agitador orbital a 32 °C *overnight*. Após incubação, as células foram centrifugadas a 5000 g por 5 min, lavadas duas vezes em solução salina estéril (0,85% de NaCl) e ressuspensas no mesmo diluente. Placas de diluição foram utilizadas para verificar a relação entre DO<sub>600</sub> e unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. A dieta foi aspergida numa proporção de 100 mL para cada 1000 g de dieta, utilizando uma diluição do inóculo em solução salina estéril para obtenção de concentração final de 10<sup>9</sup> UFC para 100 g de alimento. No caso do tratamento controle, a ração foi aspergida apenas com 100 mL de solução salina estéril pura. A dieta controle e a dieta teste (contendo a bactéria), após aspergidas com as respectivas soluções, foram embaladas em saco plástico e imediatamente mantidas a 4 °C por no máximo sete dias, quando o procedimento era refeito, da mesma forma, para todos os ensaios.

#### *Ensaio de digestibilidade*

Foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) de proteína, energia bruta, matéria seca, amido e fibras da dieta para o jundiá, suplementada ou não com a bactéria potencialmente probiótica *A. veronii*, em um delineamento inteiramente casualizado realizado em triplicata.

Seis grupos de cinco jundiás com 425,6 ± 159,94 foram estocados aleatoriamente, distribuídos em seis tanques cilíndrico-cônicos de 200 L em sistema fechado de circulação de água, com aeração constante e temperatura controlada (25,56 ± 0,8 °C). Durante o período experimental, a biomassa inicial por tanque foi de 2,1 kg. Antes da coleta de fezes, os peixes foram aclimatados às condições experimentais e à dieta experimental, a qual foi fornecida duas vezes ao dia (às 7:00 e 18:00 h) até saciedade aparente. Após a aclimação, os

peixes foram alimentados com a dieta experimental suplementada ou não com a bactéria probiótica durante 79 dias. Uma hora após a primeira alimentação diária, as paredes internas dos tanques eram limpas e cerca de 70% do volume de água renovado, a fim de evitar contaminação nas fezes. As fezes eram coletadas a cada 4 h, entre 09:00 e 17:00 h, em tubos plásticos de 50 mL, acoplados na parte inferior dos tanques e imersos em isopor com gelo para reduzir a atividade microbiana. Após cada coleta, os tubos eram centrifugados a 1150 *g* durante 5 min, o sobrenadante descartado e as fezes, secas em estufa a 50 °C e armazenadas a -20 °C para posteriores análises.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) foram determinados pela seguinte equação (Cho & Slinger 1979):

$$CDA (\%) = 100 - \left[ 100 \times \frac{\% \text{ marcador dieta}}{\% \text{ marcador fezes}} \times \frac{\% \text{ nutriente fezes}}{\% \text{ nutriente dieta}} \right]$$

#### *Análises histológicas*

O manejo dos peixes seguiu o protocolo PP00815, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

Ao final do ensaio de digestibilidade, todos os peixes foram sacrificados com superdose do anestésico Eugenol® (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) para coleta de amostras de intestino para análise histológica. Os peixes foram dissecados, os intestinos cortados em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e foram diretamente fixados em formol tamponado (fosfato 0,1 M, pH 7,2), durante 48 h. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente durante 2 h e mantidas em álcool 70% para conservação. Para a inclusão em parafina (60 °C), o material foi desidratado em sequência etanólica crescente, utilizando-se o xilol como líquido intermediário. Posteriormente, os blocos foram cortados em um micrótomo Leica RM 2025 e foram realizados cortes transversais de 5 µm de espessura dos intestinos. Os cortes foram estirados em um banho-maria termostático a 52 °C e recolhidos em lâminas para microscopia (Martoja & Martoja-Pierson 1970). Os cortes foram desparafinados, hidratados (Martoja & Martoja-Pierson 1970) e corados pela técnica tricrômica de Papanicolau. As lâminas histológicas foram fotodocumentadas em lupa (Zeiss, Stemi 2000C) e microscópio (Olympus, CX31), equipados com câmara fotográfica digital.

### *Ensaio de Desempenho*

O desempenho de juvenis de jundiá foi avaliado após alimentação com a dieta experimental extrusada, contendo ou não a suplementação da bactéria amilolítica probiótica *A. veronii*, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

No preparo da dieta experimental para este ensaio, foi omitido o óxido de ítrio.

Grupos de 15 juvenis de jundiá ( $26,19 \pm 0,32$  g) foram aclimatados por quinze dias às condições experimentais em oito tanques retangulares de polietileno de 40 L, incluídos em sistema fechado de circulação de água, com aeração constante e temperatura controlada ( $26,19 \pm 0,32$  °C).

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00 h e 16:00 h) até a saciedade aparente com a dieta experimental. Após a adaptação, os peixes foram alimentados com a dieta experimental, suplementada ou não com a bactéria *A. veronii*, durante 45 dias. O consumo alimentar foi registrado diariamente para cada unidade experimental, pesando-se o respectivo saco da dieta no início e final do dia.

Durante o período experimental, as variáveis indicadoras da qualidade de água foram registradas, resultando em: pH =  $7,09 \pm 0,18$ , oxigênio dissolvido =  $6,34 \pm 0,23$  mg L<sup>-1</sup>, salinidade =  $1,97 \pm 0,04$  g L<sup>-1</sup> e amônia total  $\leq 0,15$  mg L<sup>-1</sup>, permanecendo dentro dos limites adequados de conforto para o jundiá. A troca de água, nas unidades experimentais, foi ajustada para 0,6 L min<sup>-1</sup>.

Foram realizadas biometrias quinzenais, após jejum de 24 h, para a avaliação do crescimento dos peixes. Foi determinada, no início e final do ensaio, a composição centesimal corporal dos peixes e os dados utilizados para o cálculo das taxas de retenção proteica e energética, utilizando-se amostras de dez peixes no início do ensaio e três peixes por unidade experimental ao final do ensaio. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados com superdose do anestésico Eugenol® para coleta das amostras de composição corporal.

Foram calculados ganho em peso, consumo diário de alimento e taxa de retenção energética conforme Borba et al. (2006). A taxa de crescimento específico foi calculada de acordo com Rodrigues et al. (2012) e a eficiência alimentar foi calculada por  $GP \times I_t^{-1}$ , onde: GP é o ganho em peso médio (g), dado pela diferença entre peso médio final e inicial (g), e  $I_t$  é o consumo total de alimento (peso seco, g).

### *Análises químicas comum a ambos os ensaios*

A dieta e a composição corporal dos peixes foram analisadas segundo os procedimentos da AOAC (1999). O teor de óxido de ítrio nas dietas e fezes foi determinado pelo método de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado ICP- MS (OTTERÁ et al., 2003). A energia bruta foi obtida mediante combustão em bomba calorimétrica adiabática.

As concentrações de amido total (método AOAC 996.11) e fibra alimentar total (método AOAC 985.29) foram analisadas na dieta e fezes pelo método enzimático (MCCLEARY; GIBSON; MUGFORD, 1997) e através do kit Total Dietary Fiber (Megazyme Int. Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda) respetivamente.

### *Análises Estatísticas*

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do teste t-student para amostras independentes, bem como foram validados os pressupostos associados à utilização do mesmo. O pressuposto da normalidade das distribuições foi avaliado através do teste de Shapiro-Wilk e dos valores de assimetria e curtose. O pressuposto de homocedasticidade das variáveis foi validado pelo teste de Levene ou pela Anova Robusta (teste de Welch), no caso da homogeneidade das variâncias não se verificar. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software IBM SPSS Statistics 20.

## **Resultados**

### *Digestibilidade*

Não houve efeito da suplementação dietética com a bactéria amilolítica sobre os CDAs (Tabela 4), com exceção do CDA resultante de fibra alimentar total. Os CDAs da proteína ficaram acima de 90%, da energia bruta, acima de 83%, da matéria seca, acima de 77%. Os CDAs do amido foram semelhantes entre os tratamentos e próximos a 98%.

**Tabela 4** Coeficiente de digestibilidade aparente, nutrientes e energia digestíveis da dieta contendo ou não a suplementação da bactéria amilolítica probiótica *A. veronii*. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

|   | Dieta                        |                      | Teste t-student    |        |
|---|------------------------------|----------------------|--------------------|--------|
|   | Controle                     | Suplementada         | t                  | p      |
| <b>Coefficiente de digestibilidade aparente (%)</b> |                              |                      |                    |        |
| Proteína  | 90,1 $\pm$ 0,38              | 90,6 $\pm$ 0,47      | -0,71              | 0,528  |
| Energia   | 84,1 $\pm$ 1,25              | 83,4 $\pm$ 0,04      | Teste de Welch     |        |
| Matéria seca  | 78,2 $\pm$ 0,63              | 77,6 $\pm$ 0,59      | 1,06               | 0,367  |
| Amido   | 97,8 $\pm$ 0,50              | 97,9 $\pm$ 1,27      | Teste de Welch     |        |
| Fibra alimentar total                               | 10,06 $\pm$ 0,29             | 0,8 $\pm$ 2,78       | 3,75               | 0,006* |
| <b>Nutriente ou energia digestível (g ou kJ)</b>    |                              |                      |                    |        |
| Proteína  | 375,2 $\pm$ 1,60             | 377,2 $\pm$ 1,95     | -0,73              | 0,518  |
| Energia   | 14,5 $\pm$ 0,88              | 14,0 $\pm$ 0,67      | Teste de Welch     |        |
| Matéria seca  | 717,9 $\pm$ 4,09             | 733,77 $\pm$ 24,28   | 3                  | 0,649  |
| Amido   | 19,12 $\pm$ 0,70             | 19,15 $\pm$ 0,70     | -0,575             | 0,606  |
| Fibra alimentar total                               | 1.06 $\pm$ 0,06*             | 0,08 $\pm$ 0,2*      | 3,74               | 0,006* |
| Teste de Welch                                      | Estatística F (assimptótica) | Graus de Liberdade 1 | Graus de Liberdade | p      |
| CDA da energia <sup>a</sup>                         | 0,638                        | 1                    | 1,001              | 0,571  |
| Amido <sup>a</sup>                                  | 0,233                        | 1                    | 1,004              | 0,719  |
| Energia <sup>a</sup>                                | 12,703                       | 1                    | 1,001              | 0,174  |

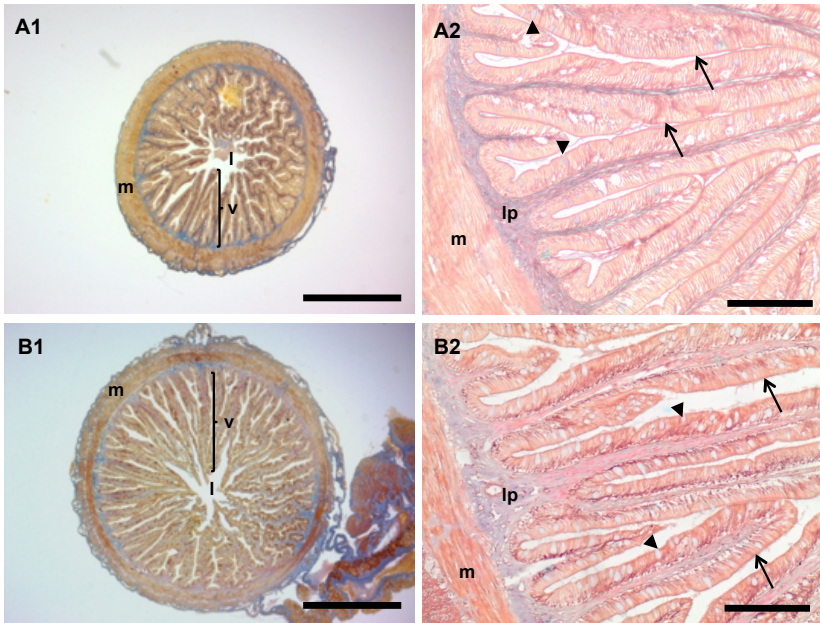
\*Indica diferença significativa.

<sup>a</sup>Resultados do teste de Welch para CDA da energia, amido e energia.

### *Análises histológicas*

Não foram observadas alterações histológicas com sinais patológicos nos intestinos dos peixes alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com a bactéria *A. veronii* (Figura 3). Todos os peixes, independente da dieta, apresentaram camada muscular com dimensões normais e vilosidades com altura e espessura normais. A lâmina própria, adjacente à camada muscular e que forma a vilosidade digitiforme, também apresentou dimensões normais, não apresentando infiltrado linfocitário nem neutrófilos, que poderiam estar relacionados à inflamação (KOLOUCH, 1939; PAGE; GOOD, 1958). Além disso, o

número de células caliciformes e a presença de borda em escova são características típicas de um intestino saudável.



**Figura 3.** Imagem panorâmica da porção mediana (A1 e B1) e detalhe de corte transversal da porção mediano-distal do intestino de jundiá (*Ramdia quelen*) (A2 e B2). Dieta controle (A) e dieta suplementada com bactéria (B). Camada muscular (m), vilosidades (v), lâmina própria (lp), células caliciformes (cabeça de seta), borda em escova (seta). Coloração: Papanicolau. Barras: 1 mm (panorâmica) e 25  $\mu$  (detalhe).

### *Desempenho e composição corporal*

A suplementação com a bactéria probiótica reduziu significativamente o ganho em peso e o peso final dos peixes (Tabela 5).

**Tabela 5** Variáveis de desempenho de juvenis de jundiá alimentados com dieta contendo ou não suplementação com a bactéria amilolítica probiótica *Aeromonas veronii*, durante 45 dias. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

| Parâmetro  | Dieta            |                  | Teste t-student |        |
|--|------------------|------------------|-----------------|--------|
|  | Controle         | Suplementada     | t               | p      |
| Peso final, g  | 52,62 $\pm$ 2,10 | 49,67 $\pm$ 1,61 | 2,03            | 0,045* |
| Ganho em peso, g dia <sup>-1</sup>                   | 0,60 $\pm$ 0,07  | 0,43 $\pm$ 0,03  | 3,76            | 0,020* |
| Taxa de crescimento específico, % dia <sup>-1</sup>  | 1,73 $\pm$ 0,10  | 1,55 $\pm$ 0,06  | 1,52            | 0,180  |
| Consumo alimentar, % peso corporal dia <sup>-1</sup> | 1,99 $\pm$ 0,07  | 1,96 $\pm$ 0,05  | 0,42            | 0,696  |
| Taxa de retenção proteica, %                         | 33,46 $\pm$ 1,97 | 33,06 $\pm$ 1,38 | 0,16            | 0,877  |
| Eficiência alimentar, %                              | 75,90 $\pm$ 5,35 | 65,52 $\pm$ 2,77 | 1,72            | 0,160  |

\*Indica diferença significativa.

A composição corporal dos peixes (Tabela 6) não foi afetada pela suplementação com a bactéria amilolítica.

**Tabela 6** Composição corporal (na matéria úmida) de juvenis de jundiá, alimentados com dieta contendo ou não a suplementação com a bactéria amilolítica probiótica *Aeromonas veronii*, durante 45 dias. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

| Fração ou índice (%) | Dieta            |                  | Teste t-student |       |
|----------------------|------------------|------------------|-----------------|-------|
|                      | Controle         | Suplementada     | t               | p     |
| Proteína bruta       | 16,27 $\pm$ 0,36 | 16,32 $\pm$ 0,40 | 0,99            | 0,926 |
| Extrato etéreo       | 7,27 $\pm$ 0,59  | 5,94 $\pm$ 0,48  | ,76             | 0,154 |
| Cinzas               | 2,93 $\pm$ 0,16  | 3,14 $\pm$ 0,06  | 1,24            | 0,282 |
| Umidade              | 73,62 $\pm$ 0,68 | 74,90 $\pm$ 0,29 | 1,74            | 0,156 |

\*Indica diferença significativa.

## Discussão

A suplementação da bactéria probiótica na dieta não favoreceu o aumento da digestibilidade do amido e outros nutrientes, nem o crescimento do jundiá. Entretanto, a suplementação dietária de *A. veronii* diminuiu o CDA da fibra alimentar total de forma significativa,

afetando também a fibra alimentar total digestível (Tabela 4) nos peixes alimentados com dieta suplementada. A microbiota intestinal do jundiá compreende bactérias celulolíticas (Pedrotti et al., 2013) e os resultados apresentados no ensaio de digestibilidade demonstram a possibilidade da *A. veronii* ter excluído parte dessas bactérias celulolíticas e/ou amilolíticas que estavam presentes no trato gastrointestinal do jundiá para efetuar a colonização desse espaço. Esta é a razão pela qual a capacidade de aderência à mucosa é considerada um importante critério para seleção de probióticos, devido à competição entre as bactérias para aderirem à mucosa do organismo hospedeiro (VINE; LEUKES; KAISER, 2006; VINE et al., 2004). Em um estudo em que foram testadas 707 cepas de bactérias aeróbicas, os autores identificaram que a maioria das bactérias que apresentaram a característica de alta aderência à mucosa intestinal, nas carpas testadas, pertenciam ao gênero *Aeromonas* (NAMBA; MANO; HIROSE, 2007), sendo *A. veronii* a representante que mostrou o maior potencial para a aderência à mucosa, dentre todas cepas avaliadas.

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), relacionados com inclusão de carboidratos na dieta para jundiá, registraram valores de CDA para milho de 55,3% a 59,1% para energia e de 50,3% a 57,2% para matéria seca (GOMINHO-ROSA et al., 2015; OLIVEIRA-FILHO; FRACALOSSO, 2006; RODRIGUES et al., 2012), inferiores aos registrados no presente estudo. Salienta-se que aqui a dieta sofreu processo de extrusão, diferente do processo de peletização, empregado nos outros estudos, que pode ter resultado na melhora dos valores de digestibilidade para energia e para matéria seca em mais de 20%. A extrusão da dieta emprega alta pressão, umidade e temperatura à mistura, proporcionando a gelatinização do amido e favorecendo a exteriorização dos nutrientes contidos no interior das células vegetais ao processo enzimático da digestão (DREW; BORGESON; THIESSEN, 2007). Outras espécies de peixes também se beneficiam do processo de gelatinização do amido através da extrusão, como o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (PERES; OLIVA-TELES, 2002) e a dourada (*Sparus aurata*) (VENOU et al., 2003).

As análises histológicas demonstraram que as poucas diferenças verificadas nos intestinos dos peixes estudados estão dentro da normalidade e se devem, em parte, à dificuldade de se obter a mesma exata porção dos intestinos entre os peixes alimentados com as diferentes dietas, no processo de microtomia (Fig. 3).



A fração do alimento conhecida como polissacarídeos não amiláceos (PNAs) é resistente à hidrólise enzimática intestinal, com completa ou parcial fermentação microbiana no intestino (AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 2001) e representa uma parte significativa do milho e do concentrado proteico de soja, ingredientes utilizados na dieta experimental, portanto, não podendo ser desconsiderada. Em animais monogástricos terrestres, há indícios de que a inserção de níveis moderados de fibras insolúveis na dieta incrementam a fermentação da fibra, ocasionada pela microbiota intestinal competente, gerando ácidos graxos de cadeia curta, acetato, propionato e butirato, que favorecem a saúde da mucosa colônica (ASP, 1996).

Pelo fato da microbiota normal do jundiá possuir bactérias celulolíticas (PEDROTTI et al., 2013), acreditamos que ocorra a presença de bactérias que fermentem as fibras da dieta nos intestinos dos peixes que receberam a dieta controle, ao contrário do que ocorreu nos intestinos dos peixes tratados com a dieta suplementada, onde essas bactérias fermentadoras podem ter sido parcialmente eliminadas pela presença da *A. veronii*. Esta parcial exclusão, poderia acarretar numa baixa fermentação dos PNAs, determinando excesso de fibras, que influenciaria negativamente o CDA de fibras totais (0,8%) nos peixes alimentados com a dieta suplementada com a bactéria probiótica, quando comparado àquele apresentado pelos peixes alimentados com a dieta controle (10,06%).

No ensaio de desempenho zootécnico, a suplementação da *A. veronii* não afetou os resultados de conversão, eficiência ou consumo alimentar; porém, o peso final e o ganho em peso (Tabela 5) foram significativamente maiores nos peixes que receberam a dieta controle. Este aumento no ganho em peso foi inesperado, considerando que a eficiência alimentar e digestibilidade dos nutrientes (exceto pelo resultado da fibra total), foram similares entre os peixes alimentados ou não com a dieta suplementada com a bactéria probiótica.

A suplementação da *A. veronii* neste estudo pode ter proporcionado a atuação desta bactéria e suas enzimas amilolíticas diretamente sobre as moléculas de amido, liberando de forma rápida a glicose. Esta liberação se daria pela quebra dos principais constituintes do amido: 1) a amilopectina, composto ramificado, de mais fácil digestão pela amilase e 2) a amilose, composto sem ramificações, com digestão mais lenta (MAZUR; NAKATANI, 1993). De toda forma, esta quebra do amido em moléculas mais simples como a maltose, tornam-nas disponíveis para absorção pelo trato digestório do jundiá (SJOFJAN;

ARDYATI, 2011). Entretanto, já foi demonstrado que o excesso de carboidrato na dieta e, conseqüentemente, de glicose no metabolismo, não é bem tolerado por esta espécie. Quando alimentado com dietas contendo aumento gradativo da relação carboidrato:lipídio, houve uma inesperada diminuição na produção de amilase e glicogênio hepático pelo jundiá (MORO et al., 2010). O excesso de carboidratos na dieta pode ter gerado uma sobrecarga metabólica, ocasionada pelo aumento dos níveis de glicose sanguínea (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002). Já em outro estudo, também foram apresentados indícios sobre a dificuldade que o jundiá encontra para digerir alimentos com excesso de carboidratos, pois dentre quatro fontes diferentes de carboidrato testadas (farelo de trigo, farelo de mandioca, milho moído e quirera de arroz), a dieta contendo farelo de trigo foi a que mostrou CDA superior para o amido, possivelmente por esta fonte de carboidrato conter menor teor de amido, além de maior quantidade de fibra, que as outras fontes testadas (GOMINHO-ROSA et al., 2015).

Os resultados não foram significativo no crescimento ou eficiência alimentar para os jundiás alimentados com dieta suplementada com a bactéria amilolítica *A. veronii*. Isto ocorreu possivelmente pela ineficiência do jundiá em regular a concentração da glicose no sangue, como fariam outros onívoros típicos, como a tilápia (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002). Portanto, talvez seja possível ter um resultado promissor desta suplementação probiótica com bactéria amilolítica em outras espécies de peixes.

O potencial para a utilização de bactérias probióticas, secretoras de variadas enzimas, para utilização na área da nutrição de organismos aquáticos é promissor. Entretanto, seria interessante também testar outros grupos de microrganismos além dos grupos *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter*, já bastante caracterizados (BALCÁZAR et al., 2006; RAY; GHOSH; RINGØ, 2012). É importante que outras cepas potencialmente probióticas sejam mais pesquisadas, como os representantes do gênero *Aeromonas*, como o alvo do presente estudo, além de outros gêneros ou espécies ainda menos estudados.

## Referências

AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 112–129, 2001.

AOAC -ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS.

**Official methods of analysis.** 16.ed. Washington, D.C. 1141p, 1999.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938–956, 2014.

ASP, N. G. Dietary carbohydrates: Classification by chemistry and physiology. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 9–14, 1996.

AZAZA, M. S. et al. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. **Aquaculture Research**, p. 14–27, 2013.

BAGHERI, T. et al. Growth , Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 43–48, 2008.

BAIRAGI, A. et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, p. 109–121, 2002.

BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173–186, 31 maio 2006.

BARRON, C. et al. Microscopical Study of the Destructuring of Waxy Maize and Smooth Pea Starches by Shear and Heat at Low Hydration. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 289–300, 2001.

BERGOT, F.; BREQUE, J. DIGESTIBILITY OF STARCH BY RAINBOW TROUT: EFFECTS OF THE PHYSICAL STATE OF STARCH AND OF THE INTAKE LEVEL. **Aquaculture**, v. 34, p. 203–212, 1983.

BOMBA, A. et al. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 121–126, 2002.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba, fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 183–191, 2006.

BUTS, J. P. et al. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. **Gut**, v. 45, n. 1, p. 89–96, jul. 1999.

CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 109, n. 2, p. 213–222, 1994.

CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 431–437, 1995.

CALHAU, C. et al. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. **Clinical biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 571–7, out. 2000.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. et al. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.

CARNEVALI, O. et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 430–438, 2006.

CASTILLO, S.; GATLIN, D. M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. **Aquaculture**, v. 435, p. 286–292, jan. 2015.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial microbes**, v. 1, n. 1, p. 3–9, mar. 2010.

CHENG, Z. J.; HARDY, R. W. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 2003.

CUVIER-PÉRES, A.; KESTEMONT, P. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 279–285, 2001.

DEUTSCH, L. et al. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. **Global Environmental Change**, v. 17, n. 2, p. 238–249, 2007.

DOUILLET, P.; LANGDON, C. J. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. **Biological Bulletin**, v. 184, n. 1, p. 36, fev. 1993.

DREW, M. D.; BORGESON, T. L.; THIESSEN, D. L. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, n. 2, p. 118–136, 2007.

EL-HAROUN, E. R.; GODA, A. M. A S.; KABIR CHOWDHURY, M. A. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473–1480, 2006.

ERFANULLAH; JAFRI, A. K. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). **Aquaculture**, v. 161, n. 1-4, p. 159–168, 1998.

FRACALOSSO, D. M.; ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S. **No rastro das espécies nativasPanorâma da Aquicultura**, 2002.

FURNE, M. et al. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 149, n. 4, p. 420–425, 2008.

GANGULY, S. et al. Supplementation of prebiotics in fish feed: A review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 195–199, 2013.

GARCÍA DE LA BANDA, I. et al. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 281–288, ago. 2010.

GARCÍA-ALONSO, A. et al. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 181–187, 1999.

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

GATESOUBE, F. J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. **Aquaculture**, v. 212, n. 1-4, p. 347–360, 2002.

GATLIN, D. M. et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 6, p. 551–579, 2007.

GATLIN III, D. M. Principles of Fish Nutrition. **Southern Regional**

**Aquaculture Center**, n. 5003, p. 1–8, 2010.

GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, n. 3-4, p. 303–314, 2000.

GERMAN, D. P. et al. Digestive enzyme Activities in Herbivorous and Carnivorous Prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 5, p. 789–804, 2004.

GLENCROSS, B. D.; BOOTH, M.; ALLAN, G. L. A feed is only as good as its ingredients? a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 17–34, fev. 2007.

GÓMEZ, R. G. D.; SHEN, M. A. Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 2, p. 215–218, 23 maio 2008.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 259–270, nov. 2000.

GOMINHO-ROSA, M. D. C. et al. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p. 92–99, jan. 2015.

GOUVEIA, A.; DAVIES, S. J. Modulation of the Post-Prandial Plasma Glucose Profile in Juvenile European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* Fed Diets Varying in Starch Complexity. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 35, n. 3, p. 392–400, 2004.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175–194, set. 2002.

HUNG, L. T. et al. Comparison of starch utilization in fingerlings of two Asian catfishes from the Mekong River (*Pangasius bocourti* Sauvage, 1880, *Pangasius hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 215–222, 2003.

IRIANTO, A; AUSTIN, B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal**

**of Fish Diseases**, v. 26, p. 59–62, 2003.

KAR, N.; GHOSH, K. Enzyme Producing Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 115–120, 2008.

KAUSHIK, S. J. et al. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*: I. Utilization of digestible carbohydrates by sturgeon. **Aquaculture**, v. 76, n. 1-2, p. 97–107, 1989.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1–14, jan. 2008.

KIESSLING, A.; ASKBRANDT, S. Nutritive value of two bacterial strains of single-cell protein for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 109, n. 2, p. 119–130, 1993.

KIM, J. D.; KAUSHIK, S. J. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 106, p. 161–169, 1992.

KOLOUCH, J. F. The lymphocyte in acute inflammation. **The American journal of pathology**, v. 15, n. 4, p. 413–428, 1939.

KRAMER, D. L.; BRYANT, M. J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet - the long and short of a convoluted issue. **Environmental Biology of Fishes**, v. 42, n. 2, p. 129–141, 1995.

KRAUGERUD, O. F. et al. Nutrient digestibilities and gut function in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. **Aquaculture**, v. 273, n. 1, p. 96–107, 2007.

KROGDAHL, Å.; HEMRE, G.; MOMMSEN, T. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 103–122, 2005.

KUHN, D. D. et al. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, n. 1-2, p. 51–57, 2009.

KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some

freshwater teleosts. **Aquaculture**, v. 148, n. 1, p. 25–37, 1996.

LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 193–201, fev. 2003.

LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J. D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 293–303, 1999.

LI, X. F. et al. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 701–708, 2013.

LOBO, C. et al. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 295–309, fev. 2014.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, n. 3, p. 331–339, 2004.

MAZUR, A. K.; NAKATANI, H. **Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of amylose and amylopectin.** *Archives of biochemistry and biophysics*, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8215418>>

MCCLEARY, B. V.; GIBSON, T. S.; MUGFORD, D. C. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 3, p. 571–579, 1997.

MELO, J. F. B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdias quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**, 2004.

MERRIFIELD, D. L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1–18, abr. 2010.



- MEYER, G.; FRACALOSSI, D. M. Protein requirement of jundiá fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 331–343, 2004.
- MOHAPATRA, S. et al. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 27 fev. 2012.
- MONDAL, S. et al. Distribution of enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. **Acta Ichthyologica Et Piscatoria**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 24 jun. 2008.
- MONDAL, S.; ROY, T.; RAY, A. K. **Characterization and Identification of Enzyme-producing Bacteria Isolated from the Digestive Tract of Bata, *Labeo bata***. [s.l: s.n.]. v. 41
- MONTES-GIRAO, P. J.; FRACALOSSI, D. M. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 4, p. 388–396, 2006.
- MORO, G. V. et al. Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 394–400, fev. 2010.
- NAMBA, A.; MANO, N.; HIROSE, H. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1307–1317, maio 2007.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Whashington, D.C.: National Academies Press, 2011.
- NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553–1573, 2010.
- OCHOA-SOLANO, J. L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food microbiology**, v. 23, n. 6, p. 519–25, out. 2006.
- OLIVA-TELES, A.; GONCALVES, P. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccaromyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 202 (3-4), p. 269–278, 2001.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C. DE; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1581–1587, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C. DE; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1581–1587, 2006.

OTTERÅ, H. et al. Feed preferences in juvenile cod estimated by inert lanthanid markers - effects of moisture content in the feed. **Aquaculture International**, v. 11, n. 1-2, p. 217–224, 2003.

PAGE, A. R.; GOOD, R. A. A clinical and experimental study of the function of neutrophils in the inflammatory response. **The American journal of pathology**, v. 34, n. 4, p. 645–69, 1958.

PANIGRAHI, A. et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, n. 4, p. 379–388, 2004.

PANSERAT, S. et al. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 2, p. 275–283, 2001.

PEDROTTI, F. S. et al. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 472–481, 2013.

PÉRES, A. et al. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 237–242, 1996.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 205, n. 3-4, p. 287–299, 2002.

RAY, A. K. et al. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. **Aquaculture Research**, p. 1462–1469, dez. 2010.

- RAY, A. K.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465–492, 20 out. 2012.
- RIBEIRO, L.; CAHU, C.; DINIS, M. T. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and. n. Dabrowski 1984, p. 61–69, 2002.
- RINGØ, E.; BIRKBECK, T. H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, n. 2, p. 73–93, 1999.
- RINGØ, E.; STROM, E.; TABACHEK, J. Intestinal microflora of salmonids : a review. **Aquaculture Research**, v. 26, p. 773–789, 1995.
- RODRIGUES, A. P. O. et al. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 65–72, 29 fev. 2012.
- RODRIGUEZ-ESTRADA, U. et al. Effects of Inactivated *Enterococcus faecalis* and Mannan Oligosaccharide and Their Combination on Growth, Immunity, and Disease Protection in Rainbow Trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 75, n. 3, p. 416–428, jul. 2013.
- SÁENZ DE RODRIGÁÑEZ, M. A. et al. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 177–185, abr. 2009.
- SARGENT, J. R.; TACON, A. G. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 2, p. 377–383, 1999.
- SCHRIJVER, R. DE; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* / and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, v. 186, p. 107–116, 2000.
- SINGH, R. K.; BALANGE, A. K.; GHUGHUSKAR, M. M. Protein sparing effect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 680–684, 2006.
- SJOFJAN, O.; ARDYATI, T. Extracellular amylase activity of amylolytic bacteria isolated from quail's (*Coturnix japonica*) intestinal tract in corn flour medium. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 5, p. 411–415, 2011.

SLAWSKI, H. et al. Total fish meal replacement with canola protein isolate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 535–542, 2013.

SONG, Z. et al. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n. 7, p. 596–602, 2006.

STEFFENS, W. Protein utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*): A brief review. **Aquaculture**, v. 23, n. 1-4, p. 337–345, 1981.

STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 109–121, jan. 2003.

SUGITA, H.; KAWASAKI, J.; DEGUCHI, Y. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. **Letters in applied microbiology**, v. 24, n. 2, p. 105–108, 1997.

SUN, Y.-Z. et al. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. e733–e740, 13 jun. 2011.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, n. 1-4, p. 146–158, dez. 2008.

TAOKA, Y. et al. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 4, p. 755–766, 2006.

TENGJAROENKUL, B. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, n. 3-4, p. 317–327, 2000.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1-2, p. 1–27, 2007.

UGOLEV, A. M.; KUZ'MINA, V. V. Fish enterocyte hydrolases. Nutrition adaptations. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 107, n. 1, p. 187–193, 1994.

VENOU, B. et al. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 225, n. 1-4, p. 207–223, 2003.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 4, p. 655–71, dez. 2000.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; VIEILLE, C. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VINE, N. G. et al. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 6, p. 319–326, 2004.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 404–27, maio 2006.

WACHÉ, Y. et al. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 470–478, ago. 2006.

WALTON, M. J.; COWEY, C. B. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 59–79, 1982.

WANG, Y. et al. Optimizing dietary protein sources for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with an emphasis on using poultry by-product meal to substitute fish meal. **Aquaculture Research**, p. 874–883, 2013.

WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture : Challenges and outlook. **Aquaculture**, v. 281, p. 1–4, 2008.

WANG, Y.-B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 259–264, set. 2007.

WATANABE, T. Strategies for further development of aquatic feeds. **Fisheries Science**, v. 68, n. 2, p. 242–252, 2002.

WEBSTER, C.D.; LIM, C.E. **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. CABI Publishing, Wallingford Oxon, UK, 2002.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 67–80, jul. 1994.

YANBO, W.; ZIRONG, X. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 3-4, p. 283–292, abr. 2006.

YUN, B. et al. Fishmeal can be totally replaced by plant protein blend at two protein levels in diets of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 69–78, 2014.

ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3-4, p. 349–353, fev. 2009.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516–524, 2006.

## CONCLUSÃO GERAL

A cepa isolada *A. veronii* mostra potencial para melhorar o processo de digestão do jundiá, fornecendo enzimas exógenas para a degradação e absorção dos nutrientes, sem apresentar quaisquer efeitos nocivos ao jundiá. A bactéria isolada do trato intestinal do jundiá produz enzimas que são comumente usadas no processo de digestão, incluindo amilase, fosfatase, lipase, esterase, peptidase e carboidrase. Outra característica favorável da *A. veronii* é sua capacidade de sobreviver à pressão exercida por diferentes níveis de pH e sais biliares.

A suplementação da bactéria probiótica na dieta não favorece o aumento da digestibilidade do amido e outros nutrientes no jundiá. Entretanto, a suplementação dietária de *A. veronii* diminuiu o CDA da fibra alimentar total de forma significativa, afetando também a fibra alimentar total digestível nos peixes alimentados com dieta suplementada.

Não foram observadas alterações histológicas intestinais significativas com a suplementação da bactéria probiótica.

Não há efeito da suplementação da dieta com a bactéria amilolítica *A. veronii* no crescimento ou eficiência alimentar do jundiá.





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns aspectos práticos foram observados durante a realização dos ensaios, cujo relato visa contribuir com o planejamento e execução de futuros ensaios com jundiá, utilizando instalações similares às do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD). No ensaio de digestibilidade, foi extinto o uso de gaiolas dentro dos tanques cilíndrico-cônicos de 200 L (que visavam facilitar a limpeza dos tanques), pelo estresse que causavam aos peixes. Este processo também acabou facilitando o manejo, reduzindo o tempo para a limpeza diária dos tanques. Após esta alteração, os peixes não regurgitaram em nenhum momento (fato comum nos experimentos conduzidos anteriormente à alteração) e se mostravam totalmente adaptados à rotina de limpeza dos tanques, sem sinais de desconforto com a introdução dos utensílios para realização da limpeza. Adicionalmente, sem as gaiolas, os peixes foram beneficiados por ganharem espaço (mesmo que em ângulo) para que eles pudessem ficar parados, trazendo conforto para a espécie que habita na natureza fundos de rios (com as gaiolas, o estímulo para a natação era constante).

Ainda no ensaio de digestibilidade, foi alterado todo o protocolo pré-existente para os horários de alimentação. Anteriormente as alimentações aconteciam de madrugada, pois era entendido que o jundiá apresentaria maior consumo nesse período, mas o que se viu é que não houve prejuízo nenhum com relação ao consumo, quando o mesmo foi alimentado às 7:00 e 18:00 h.

Durante todos os ensaios, o sistema de recirculação de água foi mantido ligeiramente salinizado ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) para profilaxia, devido à susceptibilidade de juvenis de jundiá à ictioftiríase, doença causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 112–129, 2001.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938–956, 2014.
- ASP, N. G. Dietary carbohydrates: Classification by chemistry and physiology. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 9–14, 1996.
- AZAZA, M. S. et al. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. **Aquaculture Research**, p. 14–27, 2013.
- BAGHERI, T. et al. Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 43–48, 2008.
- BAIRAGI, A. et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, p. 109–121, 2002.
- BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173–186, 31 maio 2006.
- BARRON, C. et al. Microscopical Study of the Destructuring of Waxy Maize and Smooth Pea Starches by Shear and Heat at Low Hydration. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 289–300, 2001.
- BERGOT, F.; BREQUE, J. DIGESTIBILITY OF STARCH BY RAINBOW TROUT: EFFECTS OF THE PHYSICAL STATE OF STARCH AND OF THE INTAKE LEVEL. **Aquaculture**, v. 34, p. 203–212, 1983.
- BOMBA, A. et al. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 121–126, 2002.
- BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba, fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 183–191, 2006.
- BUTS, J. P. et al. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation

after proximal enterectomy in rats. **Gut**, v. 45, n. 1, p. 89–96, jul. 1999.

CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 109, n. 2, p. 213–222, 1994.

CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 431–437, 1995.

CALHAU, C. et al. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. **Clinical biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 571–7, out. 2000.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. et al. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.

CARNEVALI, O. et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 430–438, 2006.

CASTILLO, S.; GATLIN, D. M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. **Aquaculture**, v. 435, p. 286–292, jan. 2015.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial microbes**, v. 1, n. 1, p. 3–9, mar. 2010.

CHENG, Z. J.; HARDY, R. W. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 2003.

CUVIER-PÉRES, A.; KESTEMONT, P. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 279–285, 2001.

DEUTSCH, L. et al. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. **Global Environmental Change**, v. 17, n. 2, p. 238–249, 2007.

DOUILLET, P.; LANGDON, C. J. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. **Biological Bulletin**, v. 184, n. 1, p. 36, fev. 1993.

- DREW, M. D.; BORGESON, T. L.; THIESSEN, D. L. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, n. 2, p. 118–136, 2007.
- EL-HAROON, E. R.; GODA, A. M. A S.; KABIR CHOWDHURY, M. A. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473–1480, 2006.
- ERFANULLAH; JAFRI, A. K. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). **Aquaculture**, v. 161, n. 1-4, p. 159–168, 1998.
- FRACALOSSO, D. M.; ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S. **No rastro das espécies nativasPanorâma da Aquicultura**, 2002.
- FURNE, M. et al. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 149, n. 4, p. 420–425, 2008.
- GANGULY, S. et al. Supplementation of prebiotics in fish feed: A review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 195–199, 2013.
- GARCÍA DE LA BANDA, I. et al. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 281–288, ago. 2010.
- GARCÍA-ALONSO, A. et al. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 181–187, 1999.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147–165, 1999.
- GATESOUBE, F. J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. **Aquaculture**, v. 212, n. 1-4, p. 347–360, 2002.
- GATLIN, D. M. et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 6, p. 551–579, 2007.
- GATLIN III, D. M. Principles of Fish Nutrition. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 5003, p. 1–8, 2010.
- GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of

Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, n. 3-4, p. 303–314, 2000.

GERMAN, D. P. et al. Digestive enzyme Activities in Herbivorous and Carnivorous Prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 5, p. 789–804, 2004.

GLENCROSS, B. D.; BOOTH, M.; ALLAN, G. L. A feed is only as good as its ingredients? a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 17–34, fev. 2007.

GÓMEZ, R. G. D.; SHEN, M. A. Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 2, p. 215–218, 23 maio 2008.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 259–270, nov. 2000.

GOMINHO-ROSA, M. D. C. et al. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p. 92–99, jan. 2015.

GOUVEIA, A.; DAVIES, S. J. Modulation of the Post-Prandial Plasma Glucose Profile in Juvenile European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* Fed Diets Varying in Starch Complexity. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 35, n. 3, p. 392–400, 2004.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175–194, set. 2002.

HUNG, L. T. et al. Comparison of starch utilization in fingerlings of two Asian catfishes from the Mekong River (*Pangasius bocourti* Sauvage, 1880, *Pangasius hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 215–222, 2003.

IRIANTO, A; AUSTIN, B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 59–62, 2003.

KAR, N.; GHOSH, K. Enzyme Producing Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 115–120, 2008.

KAUSHIK, S. J. et al. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*: I. Utilization of digestible carbohydrates by sturgeon. *Aquaculture*, v. 76, n. 1-2, p. 9. **Aquaculture**, v. 76, n. 1-2, p. 97–107, 1989.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1–14, jan. 2008.

KIESSLING, A.; ASKBRANDT, S. Nutritive value of two bacterial strains of single-cell protein for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 109, n. 2, p. 119–130, 1993.

KIM, J. D.; KAUSHIK, S. J. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 106, p. 161–169, 1992.

KOLOUCH, J. F. The lymphocyte in acute inflammation. **The American journal of pathology**, v. 15, n. 4, p. 413–428, 1939.

KRAMER, D. L.; BRYANT, M. J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet - the long and short of a convoluted issue. **Environmental Biology of Fishes**, v. 42, n. 2, p. 129–141, 1995.

KRAUGERUD, O. F. et al. Nutrient digestibilities and gut function in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. **Aquaculture**, v. 273, n. 1, p. 96–107, 2007.

KROGDAHL, Å.; HEMRE, G.; MOMMSEN, T. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 103–122, 2005.

KUHN, D. D. et al. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, n. 1-2, p. 51–57, 2009.

KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. **Aquaculture**, v. 148, n. 1, p. 25–37, 1996.

LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 193–201, fev. 2003.

LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J. D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the

Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 293–303, 1999.

LI, X. F. et al. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 701–708, 2013.

LOBO, C. et al. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 295–309, fev. 2014.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, n. 3, p. 331–339, 2004.

MAZUR, A. K.; NAKATANI, H. **Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of amylose and amylopectin.** **Archives of biochemistry and biophysics**, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8215418>>

MCCLEARY, B. V.; GIBSON, T. S.; MUGFORD, D. C. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 3, p. 571–579, 1997.

MELO, J. F. B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**, 2004.

MERRIFIELD, D. L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1–18, abr. 2010.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 331–343, 2004.

MOHAPATRA, S. et al. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 27 fev. 2012.

MONDAL, S. et al. Distribution of enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. **Acta Ichthyologica Et Piscatoria**,



v. 38, n. 1, p. 1–8, 24 jun. 2008.

MONDAL, S.; ROY, T.; RAY, A. K. **Characterization and Identification of Enzyme-producing Bacteria Isolated from the Digestive Tract of Bata, Labeo bata.** [s.l: s.n.]. v. 41

MONTES-GIRAO, P. J.; FRACALOSSO, D. M. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 4, p. 388–396, 2006.

MORO, G. V. et al. Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 394–400, fev. 2010.

NAMBA, A.; MANO, N.; HIROSE, H. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1307–1317, maio 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Nutrient requirements of fish and shrimp.** Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553–1573, 2010.

OCHOA-SOLANO, J. L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food microbiology**, v. 23, n. 6, p. 519–25, out. 2006.

OLIVA-TELES, A.; GONCALVES, P. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 202 (3-4), p. 269–278, 2001.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C. DE; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1581–1587, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C. DE; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1581–1587, 2006.

OTTERÅ, H. et al. Feed preferences in juvenile cod estimated by inert lanthanid markers - effects of moisture content in the feed. **Aquaculture International**, v. 11, n. 1-2, p. 217–224, 2003.

PAGE, A. R.; GOOD, R. A. A clinical and experimental study of the

function of neutrophils in the inflammatory response. **The American journal of pathology**, v. 34, n. 4, p. 645–69, 1958.

PANIGRAHI, A. et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, n. 4, p. 379–388, 2004.

PANSERAT, S. et al. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 2, p. 275–283, 2001.

PEDROTTI, F. S. et al. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 472–481, 2013.

PÉRES, A. et al. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 237–242, 1996.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 205, n. 3–4, p. 287–299, 2002.

RAY, A. K. et al. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. **Aquaculture Research**, p. 1462–1469, dez. 2010.

RAY, A. K.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465–492, 20 out. 2012.

RIBEIRO, L.; CAHU, C.; DINIS, M. T. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and. n. Dabrowski 1984, p. 61–69, 2002.

RINGØ, E.; BIRKBECK, T. H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, n. 2, p. 73–93, 1999.

RINGØ, E.; STROM, E.; TABACHEK, J. Intestinal microflora of salmonids : a review. **Aquaculture Research**, v. 26, p. 773–789, 1995.

RODRIGUES, A. P. O. et al. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis*

- niloticus). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 65–72, 29 fev. 2012.
- RODRIGUEZ-ESTRADA, U. et al. Effects of Inactivated Enterococcus faecalis and Mannan Oligosaccharide and Their Combination on Growth, Immunity, and Disease Protection in Rainbow Trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 75, n. 3, p. 416–428, jul. 2013.
- SÁENZ DE RODRIGÁÑEZ, M. A. et al. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 177–185, abr. 2009.
- SARGENT, J. R.; TACON, A. G. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 2, p. 377–383, 1999.
- SCHRIJVER, R. DE; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* / and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, v. 186, p. 107–116, 2000.
- SINGH, R. K.; BALANGE, A. K.; GHUGHUSKAR, M. M. Protein sparing effect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 680–684, 2006.
- SJOFJAN, O.; ARDYATI, T. Extracellular amylase activity of amylolytic bacteria isolated from quail's (*Coturnix japonica*) intestinal tract in corn flour medium. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 5, p. 411–415, 2011.
- SLAWSKI, H. et al. Total fish meal replacement with canola protein isolate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 535–542, 2013.
- SONG, Z. et al. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n. 7, p. 596–602, 2006.
- STEFFENS, W. Protein utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*): A brief review. **Aquaculture**, v. 23, n. 1-4, p. 337–345, 1981.
- STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 109–121, jan. 2003.
- SUGITA, H.; KAWASAKI, J.; DEGUCHI, Y. Production of amylase by

the intestinal microflora in cultured freshwater fish. **Letters in applied microbiology**, v. 24, n. 2, p. 105–108, 1997.

SUN, Y.-Z. et al. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. e733–e740, 13 jun. 2011.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, n. 1-4, p. 146–158, dez. 2008.

TAOKA, Y. et al. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 4, p. 755–766, 2006.

TENGJAROENKUL, B. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, n. 3-4, p. 317–327, 2000.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1-2, p. 1–27, 2007.

UGOLEV, A. M.; KUZ'MINA, V. V. Fish enterocyte hydrolases. Nutrition adaptations. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 107, n. 1, p. 187–193, 1994.

VENOU, B. et al. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 225, n. 1-4, p. 207–223, 2003.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 64, n. 4, p. 655–71, dez. 2000.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; VIEILLE, C. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VINE, N. G. et al. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 6, p. 319–326, 2004.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 404–27, maio

2006.

WACHÉ, Y. et al. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 470–478, ago. 2006.

WALTON, M. J.; COWEY, C. B. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 59–79, 1982.

WANG, Y. et al. Optimizing dietary protein sources for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with an emphasis on using poultry by-product meal to substitute fish meal. **Aquaculture Research**, p. 874–883, 2013.

WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. **Aquaculture**, v. 281, p. 1–4, 2008.

WANG, Y.-B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 259–264, set. 2007.

WATANABE, T. Strategies for further development of aquatic feeds. **Fisheries Science**, v. 68, n. 2, p. 242–252, 2002.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 67–80, jul. 1994.

YANBO, W.; ZIRONG, X. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 3-4, p. 283–292, abr. 2006.

YUN, B. et al. Fishmeal can be totally replaced by plant protein blend at two protein levels in diets of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 69–78, 2014.

ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3-4, p. 349–353, fev. 2009.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516–524, 2006.