

POTENCIAL DE *Bacillus* sp. SMIA-2 E SUAS ENZIMAS COMO
ADITIVOS DE RAÇÕES PARA JUVENIS DE TILÁPIA

PRISCILLA CORTIZO COSTA PIERRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2021

POTENCIAL DE *Bacillus* sp. SMIA-2 E SUAS ENZIMAS COMO
ADITIVOS DE RAÇÕES PARA JUVENIS DE TILÁPIA

PRISCILLA CORTIZO COSTA PIERRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.”

Orientadora: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P623

Pierro, Priscilla Cortizo Costa.

Potencial de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas como aditivos de rações para juvenis de tilápia / Priscilla Cortizo Costa Pierro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

97 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. aquicultura. 2. nutrição animal. 3. *Oreochromis niloticus*. 4. prebiótico. 5. probiótico. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

POTENCIAL DE *Bacillus* sp. SMIA-2 E SUAS ENZIMAS COMO
ADITIVOS DE RAÇÕES PARA JUVENIS DE TILÁPIA

PRISCILLA CORTIZO COSTA PIERRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal”.

Aprovada em 29 de outubro de 2021.

Comissão Examinadora

Prof. Fabio Costa Henry (D.Sc., Medicina Veterinária) - UENF

Prof^a. Raquel Vieira de Carvalho (D.Sc., Produção Vegetal) – UFES

**M.V. Paulo Sérgio Cruz de Andrade Júnior (M.Sc., Ciência Animal) –
Ifes/Campus de Alegre**

**Prof^a Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology)
UENF
(Orientadora)**

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por me guiarem e fortalecerem a minha fé, por estarem comigo. Agradeço em especial por permitir que meu pai esteja ao meu lado, saudável e curado, participando de mais uma etapa em minha vida.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Instituto Federal do Espírito Santo – IFES pela oportunidade de realização do curso de Doutorado Institucional – DINTER;

À prof^a. Meire Lelis Leal Martins pela orientação, por todo apoio, paciência e atenção, por ter me proporcionado grande conhecimento e aprendizado. Agradeço por sempre transmitir calma em suas falas. Que Deus a abençoe e ilumine!

Aos membros da banca examinadora, prof. Fabio Costa Henry, que foi meu professor na graduação e a vida me oportunizou reencontrá-lo; à prof^a. Raquel Vieira de Carvalho, que sempre se mostrou muito atenciosa e solícita em todos os meus questionamentos, contribuindo com novos conhecimentos; ao amigo Paulo Sérgio Cruz de Andrade Junior, por todos os anos de amizade e troca de

experiências, além de todo auxílio na técnica microbiológica. Vocês contribuíram muito para a construção dessa tese.

À minha família:

Meus pais, Carlos Jacintho da Costa e Dolores Cortizo Costa, meu porto seguro. Agradeço por me dar o maior presente da vida: a oportunidade de estudar! Gratidão por terem investido na educação das suas filhas. Sem a dedicação e o empenho de vocês, nada disso seria possível.

Minhas filhas, Helena Costa Pierro e Isabela Costa Pierro, minhas pequenas, por elas me esforço para ser cada dia melhor. Mesmo que ainda não entendam, agradeço a paciência e peço desculpas pelas ausências, principalmente quando a mamãe pedia para ficar sozinha. Vocês são a luz da minha vida, são o meu mundo.

Meu marido, Pedro Pierro Mendonça, meu grande incentivador. Agradeço por estar ao meu lado, pela família que construímos e por todo auxílio nessa e em outras tantas etapas da vida. Você é único e fundamental!

Minhas irmãs, Enaile Cortizo Costa Amaral e Aline Cortizo Costa, que são as melhores irmãs que eu poderia ter em minha vida. Amo vocês demais. Aos meus sobrinhos, Huguinho e Carol, que amo como se fossem meus filhos! Tenho orgulho imenso de vocês! À minha cunhada Aline Gama e meu cunhado Hugo Oia, agradeço por estarem comigo nessa caminhada!

À vovó Hilda – Leovegilda Rey Troitiño, obrigada por compartilhar seus ensinamentos na vida, ao longo dos seus 91 anos.

À Família Pierro Gripp, em especial aos meus sogros, Gianine Maria Pierro e Rubens Emerick Gripp, por me acolherem e incentivarem meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos, tão importantes e especiais em qualquer caminhada, principalmente: Isabelle Schwan, Leticia Paschoa, Kennedy Ferreira, Phelipe Valim, Samia Damas, Carlos Augusto Duncan, Ana Carolina Mouzer, Aloisio Favoreto, Lidianne Bicalho e Patricia do Rosario Rodrigues.

À Rosenilda Messias, por ser uma mãezona para minhas filhas e segurar as pontas em minhas ausências. Obrigada por todo cuidado e amor com as minhas meninas.

Aos alunos do LNPEO, muito obrigada por toda ajuda durante a realização do experimento: Paola Santos, David Carvalho, Thaianara Galdino, Erivelto Souza e Breno Tannuri, sempre com bom humor e muita disposição! Agradeço em especial à Thayna Pardo e Samuel Oliveira, por me acompanharem também durante o processamento histológico e na microbiologia.

À equipe do Laboratório de Patologia Animal da UFES, em especial à professora Jankerle Neves Boeloni e aos técnicos Henrique Venial e Theo Matos Arantes Moraes. Agradeço a ajuda, paciência e receptividade!

Aos amigos do DINTER, principalmente os que tive a oportunidade de estreitar os laços, e que tornaram os dias mais leves e divertidos, de ajuda mútua e muito companheirismo: Paulo Sérgio Cruz de Andrade Junior, Flavio Pavesi Simão, André Oliveira, Cesar Otaviano Penna e Raphael Pires Bolzan.

Ao professor e colega de Ifes Alexandre Cristiano, pelo auxílio na cultura microbiológica.

À querida Erica Cruz, sempre muito atenciosa e solícita, e que espero um dia poder dar um abraço bem apertado e ouvir sua super risada de pertinho!

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Produção de tilápia no Brasil	15
2.2 Utilização de enzimas e probióticos como aditivos na dieta de peixes	17
2.2.1 Enzimas exógenas usadas como aditivos	20
2.2.2 Enzimas endógenas utilizadas como aditivos	21
2.3 Nutrição e aspectos fisiológicos da digestão em peixes	25
2.3.1 Mecanismo de ação das enzimas e influência sob a atividade enzimática em peixes	28
2.4 Influências imunológicas e ambientais à adição de enzimas	32
2.5 <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	33
3. TRABALHOS	37
3.1 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, MICROBIOTA E HISTOMORFOMETRIA INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIAS (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DO <i>BACILLUS</i> SP. SMIA-2	37
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	55
3.2 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SIMBIÓTICOS NO DESEMPENHO ZOTÉCNICO E MORFOLOGIA INTESTINAL DE JUVENIS TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
(<i>Oreochromis niloticus</i>)	59
INTRODUÇÃO	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
CONCLUSÕES	78
ANEXO I – CERTIFICADO DE COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células flageladas e endosporo elipsoidal de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 (a) e células de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 cultivadas no bagaço de cana de açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho a 50°C por 72 horas (b). (Custodio, 2020; Cruz, 2017).	34
Figura 2: Unidades experimentais no LNPEO – Ifes – Campus de Alegre	41
Figura 3: Medição, por meio de paquímetro, do comprimento total do animal.	42
Figura 4: Medição, por meio de paquímetro, da altura do animal.	423
Figura 5: Retirada das vísceras, para pesagem e medição	45
Figura 6: Medição do intestino dos animais, antes de ser seccionado em 3 porções para fixação em formal a 10%.....	46
Figura 7: Emblocamento das amostras de fragmentos intestinais	47
Figura 8: Intestinos de animais do processo de maceração.	48
Figura 9: Efeito de diferentes níveis de inclusão do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 e de suas enzimas sobre o número de bactérias heterotróficas totais (a) e de esporos recuperados no intestino das tilápias (b).....	49
Figura 10: Diferentes morfologias de microrganismos isolados de intestino de juvenis de tilápia após inclusão do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 à ração, submetidos a tratamento térmico de 30°C.	50

Figura 11: Bacilos e esporos de bacilos isolados de intestino de juvenis de tilápia após inclusão do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 à ração, submetidos a incubação de 50°C.	51
Figura 12: Altura das vilosidades intestinais de peixes submetidos à adição em diferentes níveis de inclusão do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.	544
Figura 13: Unidades experimentais no LNPEO – Ifes – Campus de Alegre	641
Figura 14: Biometria com o auxílio de um paquímetro.....	65
Figura 15: Biometria de altura do animal, com o auxílio de um paquímetro.....	66
Figura 16: Retirada das vísceras, para pesagem e medição.....	67
Figura 17: Medição do intestino dos animais, antes de ser seccionado em 3 porções para fixação em formal 10%.....	68
Figura 18: Processo de emblocamento das amostras de fragmentos intestinais de juvenis de tilápia.....	69
Figura 19: Fotomicrografia do intestino dos peixes, com mensuração da altura da vilosidade.	69
Figura 20: Altura das vilosidades intestinais em peixes. 1 = Controle; 2 = Simbiótico SMIA-2; 3 = Produto comercial 1; 4 = Produto comercial 2.	74
Figura 21: Fotomicrografia de porção intestinal de peixe submetido à inclusão do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2, com mensuração da altura das vilosidades.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição basal da ração fornecida nas dietas dos peixes.	43
Tabela 2: Valor médio das variáveis em juvenis de tilápia alimentados com diferentes níveis de inclusão do Bacillus sp. SMIA-2.	52
Tabela 3: Valor médio das variáveis de peso de fígado, peso de vísceras, índice hepato- somático e índice viscero-somático em juvenis de tilápia alimentados com diferentes níveis de inclusão do Bacillus sp. SMIA-2.	53
Tabela 4: Composição basal da ração fornecida nas dietas dos peixes.	65
Tabela 5: Valor médio das variáveis em juvenis de tilápia com a adição de diferentes simbióticos comerciais e o Bacillus sp. SMIA-2.	71
Tabela 6: Valor médio das variáveis de desempenho em juvenis de tilápia com a adição de diferentes simbióticos comerciais e o Bacillus sp. SMIA-2.	72

RESUMO

PIERRO, Priscila Cortizo Costa; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro de 2021. Potencial de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas como aditivos de rações para peixes. Orientadora: Prof^a. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é um peixe de grande importância econômica na cadeia produtiva brasileira, tendo uma demanda crescente em sua produção, particularmente em criações intensivas em sistemas do tipo tanques-rede. Entretanto, o confinamento de elevadas biomassas de peixes, pode levar a perdas no desempenho zootécnico e a maior vulnerabilidade a agentes patogênicos oportunistas. Além disso, intensificar o cultivo significa aumentar a quantidade de biomassa produzida por área, o que eleva os gastos com a alimentação. Desta forma o uso de ingredientes mais baratos, que forneçam resultados satisfatórios é de grande interesse. Bactérias do gênero *Bacillus* têm se destacado como um dos grupos mais promissores capazes de promoverem melhorias no desempenho destes animais. A introdução de enzimas em rações, como as proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, também pode melhorar o desempenho de peixes, uma vez que melhoram o aproveitamento dos ingredientes das rações. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas como aditivos para

rações em peixes, comparativamente com produtos comerciais e em diferentes dosagens. A adição do *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrou eficiência no desempenho animal, contribuindo com maior ganho de peso final e maior altura das vilosidades intestinais, garantindo uma maior capacidade absorptiva.

Palavras-chave: aquicultura, nutrição animal, *Oreochromis niloticus*, prebiótico, probiótico.

ABSTRACT

PIERRO, Priscilla Cortizo Costa; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, October, 2021. Potential of *Bacillus* sp. SMIA-2 and its enzymes as feed additives for fish. Advisor: Prof. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

The tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a fish of great economic importance in the Brazilian production chain, with a growing demand for its production, particularly with intensive rearing in net-tank systems. However, the confinement of high fish biomass can lead to losses in zootechnical performance and greater vulnerability to opportunistic pathogens. Furthermore, intensifying cultivation means increasing the amount of biomass produced per area, which increases food costs. Thus, the use of cheaper attractive ingredients that provide satisfactory results is of great interest. *Bacillus* genus bacteria have stood out as one of the most promising groups capable of promoting improvements in the performance of these animals. The introduction of enzymes in feed, such as proteases produced by bacteria of the *Bacillus* genus, can also improve fish performance, as they improve the use of feed ingredients. The objective of this work was to evaluate the potential of *Bacillus* sp. SMIA-2 and its enzymes as additives for feed and fish, compared to commercial products and at different dosages. Thus, the addition of *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrated efficiency in

animal performance, contributing to greater final weight gain and greater height of the intestinal villi, ensuring greater absorptive capacity.

Keywords: animal nutrition, aquaculture, *Oreochromis niloticus*, prebiotic, probiotic.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é de fundamental importância para a economia brasileira. Conforme dados do Ministério da Agricultura, o agronegócio, em 2017, participou com 23 a 24% do Produto Interno Bruto (PIB). O aumento acumulado foi de mais de 30% nos últimos dez anos. Esse crescimento só foi possível graças ao desenvolvimento tecnológico (Sidonio et al., 2012; Brasil, 2017). Além da grande quantidade de terras, o Brasil é o maior reservatório de água doce do planeta, com mais de 8 mil km³, muito superior à do segundo colocado, a Rússia, com cerca de 4,5 mil km³ (Sidonio et al., 2012). Assim, o Brasil destaca-se pelo grande potencial para a aquicultura, pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética. Diante de tantos atributos favoráveis, o Brasil ainda possui muitas condições para desenvolver seu potencial produtivo na área de aquicultura (Rocha et al., 2013).

Apesar do Brasil estar muito aquém de seu potencial produtivo, segundo estimativas do Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento – MAPA e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, a produção pode atingir até vinte milhões de toneladas anuais, atendendo não apenas o consumo interno, mas também uma demanda externa crescente. Projeções da

FAO apontam que, até 2030, a demanda por pescados no mundo deve crescer em quarenta milhões de toneladas (Sidonio et al., 2012).

De acordo com a FAO, a aquicultura é uma atividade definida como o cultivo de organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas, envolvendo o cultivo de água doce e de água salgada em organismos sob condições controladas (SEBRAE, 2015).

Os produtos oriundos da aquicultura destacam-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal por possuírem, comparativamente, grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, minerais, cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo. As proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais para o ser humano e, assim como as proteínas do leite, do ovo e de carnes de mamíferos, as de peixes têm elevado valor biológico (OLIVEIRA SARTOR; AMANCIO, 2012).

A fim de otimizar o desenvolvimento da aquicultura, além de se obter informações que possibilitem a formulação de dietas que atendam às exigências das espécies com potencial zootécnico, faz-se necessário o estudo de técnicas de processamento que visem proporcionar melhor aproveitamento dos nutrientes das dietas, proporcionando a redução de custos de produção e um menor impacto ao meio ambiente (Polese et al., 2010).

Prebióticos são compostos não digeríveis por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo, mas seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal. Podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem incluídos por meio de fontes exógenas concentradas (Gibson & Roberfroid, 1995). Os probióticos são suplementos alimentares que contêm bactérias vivas benéficas ao hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal, tendo boas perspectivas para o uso na piscicultura, como alternativa na profilaxia de doenças e redução da utilização de antibióticos.

Além de aprimorarem as condições intestinais para os processos de digestão e absorção de nutrientes (Busanello, 2012), outras características importantes são atribuídas ao uso de probióticos, podendo-se destacar a resistência à acidez gástrica, resistência aos sais biliares, modulação na resposta imune, adesão ao tecido do trato gastrointestinal, segurança de uso comprovada, garantia de manutenção da viabilidade até o consumo, independentemente do veículo utilizado (Sturmer et al., 2012).

Os mecanismos de ação dos probióticos são: exclusão competitiva (ou competição por sítios de ação), estimulação do sistema imunológico, efeito nutricional e produção de substâncias antibacterianas e enzimas (Busanello, 2012). Para que haja a ocorrência desses efeitos benéficos no hospedeiro, as bactérias devem sobreviver, colonizar e persistir no trato gastrointestinal. Os esporos de *Bacillus* podem germinar no trato, exercendo seus efeitos benéficos no organismo do hospedeiro, como a secreção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) e/ou pela competição por nutrientes com bactérias patogênicas (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018). A produção de substâncias antimicrobianas e a capacidade de esporulação faz com que o uso de cepas de *Bacillus* seja vantajoso, pois são capazes de sobreviver em diferentes habitats e a sua presença em alimentos não implica necessariamente na deterioração ou em intoxicação alimentar, podendo ser usada na alimentação humana e animal (Abriouel et al., 2011).

Diante do exposto, objetiva-se com esse estudo avaliar o impacto do *Bacillus* sp. SMIA-2 e de suas enzimas no desempenho do crescimento e morfometria intestinal de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de tilápia no Brasil

Segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura - (PEIXE BR, 2020), a produção no Brasil de peixes em cultivo em 2019 foi de 758.006 toneladas, representando um aumento de 4,9% quando comparado ao ano de 2018, sendo praticamente toda a produção voltada para atender ao mercado interno.

Além da grande quantidade de terras, o Brasil é o maior reservatório de água do planeta, com mais de 8 mil quilômetros de costa marítima e 5,5 milhões de hectares de água doce. Assim, o Brasil destaca-se pelo grande potencial para a aquicultura, pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética (Rocha et al., 2013).

Conforme o atual relatório, Produção Pecuária Municipal (2018) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil está em crescente expansão do mercado aquícola. Entre 2008 e 2014, o setor teve um crescimento de 54%, sendo a piscicultura de água doce a principal categoria (Pedroza Filho; Routledge, 2016). A Região Sul a responsável por 32% da produção nacional. Em seguida vêm as Regiões Norte e Nordeste (ambas com 19%) e Sudeste (17,8%). Dentre os estados, o Paraná assume a liderança (23,4%), seguido por São Paulo (9,9%) e Rondônia (9,7%) (IBGE, 2018).

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais cultivada no Brasil, seguido do tambaqui (*Colossoma macropomum*). A tilápia foi responsável por 60% da produção de peixes no Brasil, sendo a Região Sul a maior produtora (45,8%) (IBGE, 2018). Com esse aumento na produção, o Brasil passou a ser o quarto maior produtor de tilápias no mundo, sendo liderado por China, Indonésia e Egito (PEIXEBR, 2020).

A espécie apresenta diversos fatores que facilitam o seu cultivo: facilidade de reprodução e obtenção de alevinos; a possibilidade de manipulação hormonal do sexo para obtenção de populações masculinas; a boa aceitação de diversos tipos de alimentos; a grande capacidade de aproveitar alimentos naturais em viveiros; bom crescimento em cultivo; grande rusticidade, suportando bem o manuseio intenso e os baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e sua grande resistência às doenças; a carne branca, de textura firme, sem espinhos, de sabor pouco acentuado e de boa aceitação (Kubitza, 2000).

Por ser a espécie mais cultivada no país, a tilápia tem um papel cada vez mais importante na economia de diversas regiões. Assim, a nutrição e alimentação desses animais em cultivos é alvo de muitas pesquisas e de grande interesse pela indústria de alimentação animal (Furuya; Furuya, 2010).

A dieta dos peixes e a intensificação da produção influenciam diretamente o comportamento, saúde, funções fisiológicas, reprodução, crescimento e, principalmente, as condições ambientais do sistema de produção (Cyrino et al., 2010). O manejo inadequado e o fornecimento de alimentos de baixa qualidade, ou não balanceados, podem causar deficiências na absorção dos nutrientes e acúmulo de matéria orgânica no ambiente (Sado; De Almeida Bicudo, 2012).

Altas densidades de estocagem na piscicultura resultam em maiores produções e, conseqüentemente, em um maior retorno econômico (Marengoni, 2006). Porém, os sistemas intensivos, caracterizados pela alta densidade populacional, levam ao estresse nos animais, prejudicando o sistema imunológico dos peixes (Sado; De Almeida Bicudo, 2012).

Segundo dados do Boletim Informativo do Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal – SINDIRAÇÕES (2020), no primeiro trimestre de 2020 a produção de ração para peixes e camarões foi de 393 mil toneladas, sendo a maior parte voltada para a produção de tilápias pelas cooperativas no Paraná. Quando em ambientes naturais, os peixes são capazes de balancear a dieta optando por

alimentos que possam suprir as exigências nutricionais e as preferências alimentares, animais ou vegetais, sendo raro ocorrer sintomas nos animais sob essas condições (Rotta, 2003).

Os peixes teleósteos, como o caso da tilápia, o espectro alimentar sofre influência das condições ambientais, havendo uma plasticidade trófica, em que o animal se aproveita de uma fonte alimentar mais vantajosa em um determinado período de tempo (Abelha, Agostinho. Goulart, 2001). Porém, em criações intensivas, é necessário a utilização de rações balanceadas e inclusão de aditivos, auxiliando a atividade das enzimas endógenas e atuando em substratos que não são degradados naturalmente (Gomes et al., 2016).

A fim de reduzir possíveis impactos, o uso de enzimas exógenas adicionadas às rações possui o objetivo de minimizar ou remover alguns fatores antinutricionais, melhorar o valor nutricional (digestão e absorção de nutrientes), reduzir a excreção de fósforo e nitrogênio, reduzindo os impactos ambientais (Cyrino et al., 2010; Gomes et al., 2016). Assim, a produtividade e uma maior rentabilidade na piscicultura dependem da obtenção de alimentos que satisfaçam os requerimentos em nutrientes essenciais (Santos, 2017).

2.2 Utilização de enzimas e probióticos como aditivos na dieta de peixes

A Instrução Normativa nº.13 de 30 de novembro de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define como aditivo para produtos destinados à alimentação animal como “substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais”.

Segundo Gomes et al (2016) as enzimas e os complexos enzimáticos exógenos incorporados às rações, de acordo com sua finalidade, podem ser divididos em duas categorias: enzimas que possuem produção endógena, mas que são destinadas a complementar a ação no organismo (protease, amilase, lipase, entre outros) e enzimas que não são sintetizadas pelos peixes (fitase, xilanasas, celulase, entre outros).

As enzimas são em sua maioria, proteínas, que possuem como função agir como catalisadores biológicos, aumentam a velocidade das reações. Possuem sítio de ação específico e atuam em condições favoráveis de pH, temperatura, havendo um limiar ótimo para que sua atividade máxima ocorra (Campestrini; Silva; Appel, 2005; Gomes et al., 2016). A produção de enzimas destinadas à alimentação animal atingiu escala comercial na década de 1980, sendo os fungos, bactérias e leveduras as principais fontes de enzimas exógenas (Campestrini; Silva; Appel, 2005).

Atualmente, as enzimas comercialmente produzidas para os animais aquáticos são geralmente provenientes de bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Aspergillus* (Stech, Carneiro, Pizauro Junior, 2009). A formulação de dietas para peixes objetiva a exigência energética e dessa forma a relação energia/proteína merece grande atenção.

Os produtos de origem animal (farinha de peixe, carne, osso e sangue) têm sido substituídos por produtos de origem vegetal, devido ao alto valor proteico e baixo custo. No entanto, nem todos os componentes vegetais são digeridos pelos peixes, possuindo muitos efeitos antinutricionais (Santos, 2017).

Antinutrientes são definidos como substâncias que, isolados ou por meio de metabólicos, interferem na utilização e aproveitamento dos alimentos, afetando a saúde a produção animal. Podem ser divididos em quatro grupos: fatores que afetam a utilização e digestão de proteínas; fatores que afetam a utilização de minerais; antivitaminas e algumas substâncias nocivas, como micotoxinas, mimosinas, cianogênios, saponinas (Francis; Makkar; Becker, 2001).

No quadro a seguir estão os principais fatores antinutricionais em alimentos utilizados em rações para peixes.

Quadro 1: Principais antinutrientes presentes em alimentos vegetais (Francis et al., 2001).

Nutrientes de origem vegetal	Fatores antinutricionais
Farelo de soja	Inibidores da protease, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrogênios, antivitaminas, alérgenos
Farinha de canola	Inibidores da protease, glucosinolatos, ácido fítico, taninos
Farinha de tremoço	Inibidores de protease, saponinas, fitoestrogênios, alcalóides
Farinha de ervilha	Inibidores da protease, lectinas, taninos, cianogênios, ácido fítico, saponinas, antivitaminas
Torta de óleo de girassol	Inibidores da protease, saponinas, inibidor da arginase
Farinha de algodão	Ácido fítico, fitoestrogênios, gossipol, antivitaminas, ácido ciclopropenóico
Farinha de folhas de Leucaena	Mimosina
Farinha de folhas de alfafa	Inibidores da protease, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas
Torta de óleo de mostarda	Glucosinolatos, taninos
Farinha de gergelim	Ácido fítico, inibidores de protease

A utilização de polissacarídeos não amiláceos são comumente usados em rações para peixes. São componentes da parede celular em alimentos de origem vegetal (celulose, hemicelulose e pectinas), sendo geralmente encontrados nos cereais (cevada, milho, sorgo, soja, trigo, aveia, arroz, centeio, etc.) e em algumas leguminosas.

Podem comprometer o desempenho animal, dependendo da concentração, pelo fato de os peixes não possuírem enzimas capazes de degradá-los (Meurer;

Hayashi, 2003; Tachibana et al., 2010), afetando a digestibilidade do nutriente e modificando o tempo de permanência no trato digestivo (De Brito, 2008).

Apesar de os polissacarídeos serem classificados como solúveis e insolúveis, ambos possuem capacidade para ligar-se a grandes volumes de água. Essa atividade antinutricional causa um aumento da viscosidade do conteúdo intestinal, levando à diminuição na velocidade de passagem dos alimentos, dificultando a ação das enzimas endógenas, prejudicando o transporte dos nutrientes e a difusão (De Brito, 2008).

Ingredientes vegetais também são ricos em fitato, que é um elemento não digerível para o peixe, devido à ausência da enzima fitase. É de fundamental importância no metabolismo dos peixes, e sua deficiência está relacionada a redução na taxa de crescimento e baixa mineralização óssea (Mendonça et al., 2012). Assim, além de contribuir com o desempenho do animal, o uso da fitase ainda reduz os impactos ambientais diminuindo o excesso de fósforo na água (Furuya et al., 2018).

É importante ressaltar que os fatores antinutricionais não são tóxicos aos animais, uma vez que são gerados nos alimentos pelo metabolismo normal da espécie, mas promovem um efeito oposto à nutrição adequada e desejável, causando crescimento reduzido, queda conversão alimentar, menor digestibilidade de nutrientes e consequente diminuição no desempenho animal (Meurer; Hayashi, 2003; Campestrini; Silva; Appel, 2005).

Dessa forma, a adição de enzimas digestivas na piscicultura é necessária para aumentar a absorção de nutrientes, diminuir os impactos ambientais e consequentemente os custos de produção (Tachibana et al., 2010).

2.2.1 Enzimas exógenas usadas como aditivos

Dentre as principais enzimas não produzidas pelos peixes e incorporadas à ração estão a fitase e celulase. A fitase (mio-inositol hexaqui-fosfato fosfohidrolase) é uma enzima pertencente ao grupo das fosfatases e são geralmente encontradas em grandes quantidades na natureza, no solo, e pode ser produzida por fungos (*Aspergillus*), bactérias (*Bacillus subtilis* e *Pseudomonas*), além de microrganismos ruminais.

É responsável pela hidrólise do fitato, que é forma primária de armazenamento de fósforo nas plantas (Brandão, 2009). A celulase é uma enzima

responsável por hidrolisar a celulose insolúvel, que pode representar até 50% do peso seco total da planta. Pode ser produzida por inúmeros microrganismos, dentre os quais se destacam *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Clostridium*, além de alguns fungos (Sadhu; Maiti, 2013).

Outras enzimas, como a xilanase e a beta glucanase, por exemplo, também vêm sendo incorporadas às rações com o objetivo de reduzir os fatores antinutricionais e os possíveis impactos ambientais. A xilanase (endoxilanase ou beta xilanase) é uma enzima produzida a partir de fungos *Aspergillus*, responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações com xilana, que é o maior constituinte da hemicelulose, representando até 35% do peso seco total da planta (Motta, 2008).

A enzima beta glucanase, por sua vez, é responsável pela hidrólise de substratos de beta glucanos insolúveis. Os beta glucanos são responsáveis pela rigidez celular, e alguns têm sido associados à modulação do sistema imune, propiciando uma melhor resposta a nível imunológico, tanto em animais quanto em humanos (Garcia, 2008; Edison; Shiburaj; Pradeep, 2017).

2.2.2 Enzimas endógenas utilizadas como aditivos

Os peixes são animais generalistas, podendo mudar o hábito alimentar ao longo da vida, sendo esta adaptação mais comum em onívoros do que em carnívoros. Algumas enzimas são produzidas pelos peixes, mas são adicionadas à ração com o objetivo de suplementar a atividade enzimática no organismo, como a amilase, proteases (tripsina, quimiotripsina, etc.), lipase, entre outras (Stech; Carneiro; Pizauro Junior, 2009).

A amilase é uma enzima que possui origem pancreática em peixes, que age no intestino delgado sobre os polissacarídeos (MOURA et al., 2007). A amilase, quando administrada de forma exógena, tem como função diminuir a viscosidade da digestão, facilitando a ação de outras enzimas (Stech; Carneiro; Pizauro Junior, 2009).

As proteases são enzimas que podem ser encontradas em fontes animais, vegetais ou microrganismos, responsáveis por clivar as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, envolvido diretamente no processo de digestão (Oliveira, 2015).

A lipase é responsável pela quebra da gordura em ácido graxo e glicerol, e ocorre nos peixes no pâncreas, fígado, intestino e ceco pilórico dos peixes, sendo

as de origem pancreática a mais importante no processo de digestão das gorduras (Rotta, 2003).

Utilizar complexos enzimáticos pode permitir que diversas enzimas possam atuar de forma simultânea, proporcionando maior disponibilidade de proteína e energia nas dietas e melhor aproveitamento dos nutrientes pelos animais (Gomes et al., 2016).

Dessa forma, diversos estudos têm sido conduzidos a fim de avaliar diversos complexos enzimáticos em diferentes concentrações, com o objetivo final de reduzir os fatores antinutricionais, melhorar a conversão alimentar e no desempenho zootécnico do animal, além de reduzir os impactos ambientais. Segundo Castillo e Gatlin (2015), é de fundamental importância na aquicultura a utilização de ingredientes a base de vegetais em substituição à farinha de peixes, a fim de garantir a sustentabilidade.

Porém, o maior entrave dessa substituição seriam os fatores antinutricionais, que interferem diretamente no desempenho dos animais. Apesar de os estudos na aquicultura ainda serem escassos, possui um grande potencial, uma vez que a utilização de enzimas exógenas na alimentação de não ruminantes é extensa.

Em um estudo com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Gomes et al (2019) avaliaram o desempenho (ensaio I) e a taxa de excreção de amônia (ensaio II), acrescentando um complexo enzimático composto por protease, fitase, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase e pectinase. No ensaio I, os animais alimentados com ração reformulada com inclusão em níveis do complexo enzimático apresentaram maior ganho de peso do que os alimentados sem o complexo enzimático. Em relação ao ensaio II, os animais que receberam a dieta sem suplementação do complexo enzimático apresentaram maiores taxas de excreção de amônia, enquanto as menores taxas de excreção de amônia (mg/kg/h) foram dos peixes que receberam a dieta com inclusão de 0,025% do complexo enzimático, resultando, de maneira geral, efeitos benéficos na inclusão do complexo enzimático para tilápias.

Efeitos benéficos também são relatados por Brito (2019). Em um dos seus experimentos, avaliou o desempenho produtivo, histologia intestinal, parâmetros bioquímicos e microbioma de juvenis de tilápia do Nilo durante 90 dias de experimento, em rações sem ou com adição de xilanase e β -glucanase. Ao final do

experimento e análise dos dados, concluiu-se que a adição de xilanase e β -glucanase melhorou o desempenho produtivo, aumentou as vilosidades intestinais e modulou a microbiota intestinal de tilápias do Nilo, de forma que a microbiota intestinal exerce influência na resistência a doenças, o desenvolvimento e a sobrevivência.

Utilizando um complexo enzimático (amilase, protease, celulase, lipase, pectinase, xilanase, β -glucanase e fitase) Signor et al (2010) avaliaram o desempenho e a composição química da carcaça a níveis de 0; 0,033; 0,066 ou 0,099% de complexo enzimático fornecidos à tilápias. Ao nível de 0,066% de inclusão foi verificado benefícios na conversão e eficiência alimentar, mas não houve interferência no desempenho dos animais.

A fim de verificar o desempenho de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), Nunes et al (2006) utilizara diferentes concentrações das enzimas amilase, lipase e protease, em experimentos independentes. Houve uma resposta positiva para adição de amilase e lipase, a 0,05% e 0,2%, respectivamente, porém não foi verificada nenhuma influência da protease nos animais.

Mendonça et al (2012), em trabalho com a mesma espécie, o tambaqui, avaliaram a adição de fitase em diferentes concentrações e obtiveram respostas satisfatórias em relação à inclusão de doses, porém sempre acima de 1400 UFA/kg de ração. Também utilizando a mesma espécie e diferentes níveis de fitase, Brandão et al (2015), não verificaram melhorias no desempenho zootécnicos dos animais.

Em tilápias, Pontes et al (2019) avaliaram o desempenho zootécnico adicionando a enzima fitase granulada e líquida à ração. Verificou-se que a fitase na forma líquida apresentou muitos benefícios quando comparada à fitase granulada, como a melhoria do desempenho, melhor conteúdo de proteínas na carcaça e coeficiente de digestibilidade. Além disso, seu fornecimento na forma líquida pode ser adicionado em concentrações menores, gerando respostas satisfatórias.

Em estudo conduzido por Bock et al (2007), verificou-se que a inclusão de fitase para tilápias durante a fase de crescimento aumentou a biodisponibilidade do fósforo, diminuindo a eliminação no ambiente, e conseqüentemente reduzindo possíveis danos ambientais.

Utilizando alevinos de carpa (*Cyprinus carpio*), Rocha et al (2010) avaliaram o desempenho produtivo e as características de carcaça sob tratamentos com a inclusão de fitase em diferentes níveis. Apesar de não encontrarem diferenças no desempenho, houve uma melhora nas características da carcaça.

Com alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*), a inclusão de fitase até 1500 UAF/kg teve uma resposta benéfica no ganho de peso, na taxa de crescimento e nas características de carcaça. O excesso de gordura na carcaça não é uma característica desejável, pois pode interferir nas características organolépticas do alimento, além de prejudicar a qualidade durante o congelamento (Rocha et al., 2007).

A partir de duas dietas diferentes, um controle (36% de proteína e 17% de polissacarídeos não amiláceos) e outra de baixa qualidade (32% de proteína e 30% de polissacarídeos não amiláceos), Maas (2020) utilizou três tratamentos, o primeiro sem adição de nenhuma enzima, o segundo com fitase e o terceiro uma associação entre fitase e xilanase. Ao final do experimento, verificou-se que efeito da fitase na melhoria da digestibilidade e desempenho dos nutrientes foi independente da qualidade da dieta, enquanto o efeito da xilanase foi dependente da qualidade da dieta (não houve melhorias na dieta controle, apenas na de baixa qualidade).

A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), um peixe de hábito herbívoro, foi utilizada para o estudo da celulase exógena, fornecendo como alimento a lentilha, que é rica em carboidratos. Como a utilização de carboidratos na dieta de peixes ainda é limitada, os resultados foram satisfatórios, promovendo, além do crescimento da carpa, aumento da atividade de algumas enzimas digestivas, como amilase e protease (Zhou et al., 2013).

A enzima carboidrase, amplamente utilizada na suinocultura e na avicultura, ainda tem seu uso restrito na aquicultura devido à escassez de estudos. Segundo Castillo e Gatlin (2015), melhora a digestibilidade de carboidratos, proteínas e lipídios, mas os efeitos da administração exógena da enzima no desempenho dos peixes ainda não estão claros.

Além de propiciar melhores benefícios digestivos, alguns pesquisadores utilizam os probióticos contra infecções. Em uma revisão sobre o uso de probióticos em salmonídeos contra *Aeromonas*, importante bactéria causadora de doenças no meio aquáticos, Fečkaninová et al (2017) afirmam que o uso de probióticos é

promissor, mas deve existir mais estudos com outros microrganismos e in vivo. Apesar de promissor, o uso de enzimas exógenas na aquicultura ainda requer muitos ensaios.

Dessa forma, a adição de enzimas exógenas na aquicultura pode ser uma alternativa ao uso de alguns nutrientes, diminuindo a contaminação ambiental. Os estudos disponíveis utilizam uma infinidade de espécies de peixes, com diferentes hábitos alimentares, além de dietas diversas em níveis de inclusão de aditivos e ingredientes principais.

Além disso, muitas publicações utilizam associações entre prebióticos e probióticos, complexos enzimáticos, dificultando o entendimento do mecanismo de ação de cada componente na fisiologia animal, tornando a comparação entre os estudos ainda uma incógnita.

2.3 Nutrição e aspectos fisiológicos da digestão em peixes

Com o avanço da piscicultura nas últimas décadas, houve uma intensificação no estudo que visam às necessidades nutricionais em peixes, pois a dieta exerce influência sobre diversos parâmetros, como sanidade, fisiologia, reprodução, crescimento e comportamento.

Os animais precisam de proteínas, gorduras, hidratos de carbono, fibras, vitaminas e minerais na formulação de sua dieta, porém há uma enorme variação entre quantidade de nutrientes, espécie, idade do animal e condições ambientais, de modo que esses fatores ainda não estão consolidados para a maioria das espécies de cultivo (Santos, 2017).

Os alimentos são fontes naturais de nutrientes, que podem ser divididos em macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios) e micronutrientes (vitaminas e minerais), de acordo com a proporção na dieta (Moraes; De Almeida, 2020). Em peixes, existem diferenças consideráveis entre espécies na requisição dos nutrientes, na capacidade de digestão e aos hábitos alimentares, que podem ser classificados como carnívoros (se alimentam de proteína animal), herbívoro (se alimentam de vegetais) ou onívoro (se alimentam de fontes animal e vegetal) (Volkoff; London, 2018).

Em geral, os peixes em seu habitat natural são capazes de balancear a dieta escolhendo alimentos que possam suprir as suas exigências e possuem a

habilidade de adaptação, decorrente das mudanças na dieta, aos processos digestivos, como secreção enzimática, absorção e transporte de nutrientes (Stech; Carneiro; Pizauro Junior, 2009). No entanto, em peixes em sistema de criação intensiva, o alimento natural torna-se escasso, havendo a necessidade da formulação de uma ração balanceada e que atenda às demandas nutricionais (Rotta, 2003).

As proteínas são componentes essenciais de todos os seres vivos, sendo responsáveis por fornecer aos peixes aminoácidos essenciais, importantes para o crescimento, desenvolvimento, funções enzimáticas, formação de tecido muscular e para a reprodução (Volkoff; London, 2018). As proteínas de origem animal possuem valores nutricionais mais altos que as proteínas de origem vegetal, mas não há grande disponibilidade no mercado e possuem um alto valor comercial, que encarece o custo de produção.

O uso de fontes proteicas de origem vegetal é vantajoso pelo fato de estarem disponíveis de forma constante ao longo do ano, além do custo relativamente inferior, mas pode provocar um desequilíbrio de aminoácidos, além de apresentarem fatores antinutricionais. O farelo de soja, considerado melhor fonte proteica de origem vegetal, também possui fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e polissacarídeos não amiláceos. O farelo de canola, por exemplo, possui glicosinatos, taninos e ácido fítico, que inibem algumas funções digestivas em peixes. O farelo de girassol, apesar do grande teor proteico, possui compostos fenólicos, que levam à redução da digestibilidade (Bergamin et al., 2013).

Os carboidratos são importantes pois fornecem a glicose como fonte de energia para os tecidos. Porém, a capacidade de digestão pelos peixes é variável entre as espécies, e a maioria das espécies possuem limitações em sua metabolização. Podem ser depositados na forma de glicogênio no fígado e nos músculos, sendo acessíveis fontes de energia (Volkoff; London, 2018). Como há escassez na oferta de carboidratos no ambiente aquático, os peixes podem ser melhor adaptados à utilização de proteínas e lipídios como fontes energéticas (Moraes; De Almeida, 2020).

Os lipídios (triglicerídeos, fosfolipídeos e esteróis) são responsáveis por proporcionar uma maior palatabilidade aos alimentos (Moraes; De Almeida, 2020), e são necessários para o crescimento, absorção de vitaminas lipossolúveis no intestino e manutenção estruturais e das células. Os triacilgliceróis são os principais

meios de armazenamento de energia nos animais e os fosfolípidos são constituintes de membranas celulares. Os esteróis (colesterol) atuam como precursores de hormônios esteroides, sendo responsáveis pelo desenvolvimento gonadal (Volkoff; London, 2018).

Os peixes são capazes de formar gordura a partir dos macronutrientes presentes nos alimentos (lipídios, carboidratos e proteínas), porém, as proteínas só poderão ser formadas pela quebra de proteínas ingeridas na alimentação. Dessa forma, se não houver uma ingestão suficiente de proteínas, haverá atraso no desenvolvimento e/ou perda de peso, sendo necessário a oferta contínua de aminoácidos (Santos, 2017).

As vitaminas são compostos orgânicos que participam de diversas funções: homeostasia sanguínea, síntese de DNA, importantes do processo de visão, entre outros, ainda que em pequenas quantidades (Gore, 2006). São divididas em hidrossolúveis e lipossolúveis, e geralmente não são sintetizadas pelos peixes, mas sua deficiência pode ocasionar em crescimento reduzido e baixos índices reprodutivos (Volkoff; London, 2018). Assim, em criações com altas densidades, as vitaminas devem ser suplementadas à dieta, a fim de propiciar um melhor crescimento (Santos, 2017). As vitaminas mais comumente estudadas em peixes são A (retinol), C (ácido ascórbico) e E (tocoferol). A vitamina A é importante para o desenvolvimento embrionário, pois possui papel no desenvolvimento ósseo, formação de retina e diferenciação de células imunes, sendo a maior parte armazenada no fígado, mas também é encontrada nas gônadas durante o período de maturação. A vitamina C atua no desenvolvimento ovariano, esteroidogênese, vitelogenese e embriogênese. A vitamina E age também em funções reprodutivas, influenciando a qualidade das gônadas, fecundidade, qualidade dos ovos, desenvolvimento embrionário, porcentagem de fertilização, eclosão e a sobrevivência de larvas. A associação entre as vitaminas C e E atuam como agentes antioxidantes, reduzindo os radicais livres e também agem melhorando a qualidade do ovo e do sêmen (Volkoff; London, 2018).

Os minerais são elementos inorgânicos, importantes componentes estruturais de tecidos, fluidos, e catalisadores de enzimas. Podem ser divididos em dois grupos, os macrominerais, que estão presentes em maior nível corpóreo e, portanto, necessários em maior quantidade na dieta (sódio, cloreto, potássio e fósforo) e os microminerais (ou minerais traços) que são necessários em

pequenas quantidades como componentes de sistemas enzimáticos e hormonais (cobre, ferro, cromo, iodo, zinco e selênio) (Craig et al., 2017; Volkoff; London, 2018).

O fósforo é essencial para que haja um desenvolvimento adequado, está distribuído em todo o organismo e é um importante constituinte do tecido esquelético (Furuya et al., 2008). É o mineral mais crítico na dieta em peixes, sendo exigido em grandes quantidades, mas há pouca disponibilidade na água e sua absorção é limitada (Volkoff; London, 2018).

A deficiência do fósforo ocasiona uma baixa mineralização óssea e compromete o crescimento (Mendonça et al., 2012). A maior parte do fósforo está sob a forma inorgânica de fitato, componente presente em todas as sementes e células vegetais, que podem se ligar fortemente com cálcio, magnésio, zinco, cobre, ferro e potássio para formar sais insolúveis, afetando negativamente a absorção e digestão dos minerais nos peixes. Dessa forma, a utilização de dietas suplementadas com fitase são cada vez mais importantes (Kumar et al., 2012).

A evolução na aquicultura estabelece como objetivo principal o aumento da produtividade, e o cultivo de cereais (milho) e leguminosas (soja, algodão, canola, girassol) é utilizado com o objetivo de suprir as necessidades proteicas dos animais nas rações. Como existem no valor dos nutrientes dos grãos, adicionam-se compostos que possam melhorar o aproveitamento do alimento. Assim, o uso de biotecnologias abrange todo o sistema de criação: alimentação, saúde, reprodução e seleções genéticas (Malajovich, 2004).

Como agentes biológicos, as enzimas podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, possuindo muitas vantagens nos processos tecnológicos, como a especificidade, biodegradabilidade e o fato de serem manuseadas em condições controláveis (Malajovich, 2004). As enzimas de origem microbiana têm maior utilização, pois a produção é independente de fatores sazonais, utilização de substratos de baixo custo (resíduos agrícolas, por exemplo) e rendimento elevado com a otimização das condições no processo fermentativo (Monteiro, 2009).

2.3.1 Mecanismo de ação das enzimas e influência sob a atividade enzimática em peixes

2.3.1.1 Fitase

As fitases (hexafosfato de mioinositol) são pertencentes à classe das hidrolases e estão difundidas pela natureza, podendo ser derivada de animais, vegetais ou microrganismos, sendo este último os mais utilizados. São responsáveis pela hidrólise do fitato, formando inositol e fosfatos, e disponibilizando o fósforo para absorção explorado (Delmaschio, 2018).

O fitato é um derivado do mioinositol, principal forma de armazenamento de fósforo orgânico nos vegetais, mas atua como um fator antinutricional em não ruminantes. No processo de amadurecimento da planta, há acúmulo de quantidade consideráveis de fitato nas sementes de cereais e leguminosas (Pontes, 2019). Além disso, devido à ausência de fitase no trato digestivo de não ruminantes, são excretados e causam poluição ambiental (Singh et al., 2020).

O fitato é capaz de se ligar a íons metálicos, formando complexos com proteínas e enzimas, no estômago dos animais, afetando a estrutura proteica e reduzindo a digestibilidade da proteína. Para que as fitases possam ter uma ótima atividade, devem possuir alta capacidade de degradação do fitato, resistência à temperatura e atividade em ampla faixa de pH (Pontes, 2019).

A classificação das fitases pode ser baseada no pH ótimo, existindo a fitase ácida, neutra e alcalina, sendo as ácidas as mais conhecidas e produzidas por inúmeros microrganismos. As fitases ácidas são muito ativas, sendo derivadas principalmente de fungos; as fitases neutras têm efeito limitado e são derivadas de algumas bactérias e fungos; as fitases alcalinas têm sua atividade geralmente dependente de Ca^{+2} , indicando que o cálcio possui a função de cofator da enzima. Em peixes, foi observado que a fitase alcalina pode ser utilizada para aumentar a disponibilidade de fósforo, com faixa ideal de pH 7,0 a 8,0, próximo ao pH intestinal dos animais (Singh et al., 2020).

2.3.1.2 Celulase

As celulasas são enzimas que podem ser sintetizadas por muitos microrganismos, sendo a maioria das celulasas comerciais de origem fúngica, porém as bacterianas têm sido consideradas como produtoras de enzimas robustas e versáteis devido à sua alta taxa de crescimento, estabilidade em condições extremas e presença de complexos multienzimáticos (Ladeira et al., 2015).

A celulase desempenha um importante papel na hidrólise da ligação β -1,4-glicosídica da celulose, componente dominante da parede celular dos vegetais.

Para que haja a hidrólise completa da celulose, é necessário o sinergismo de três enzimas celulolíticas, as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase, a fim de converter a celulose em glicose (Ferreira et al., 2020).

A primeira enzima a atuar é a endoglucanase que age na região interna da fibra da celulose, clivando sua cadeia linear, especificamente nas ligações β -1-4 internas. As exoglucanases atuam na região externa da celulose, agindo nos resíduos expostos pela ação anterior, liberando celobiose (dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose). As β -glicosidase tem a capacidade de hidrolisar a celobiose e outros oligossacarídeos em glicose (Ferreira et al., 2020).

A temperatura ótima para a atuação da maioria das celulases está acima de 40°C. Quando produzidas por fungos, as celulases apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida, 3,6 a 5,0, enquanto as originadas de bactérias são ativas em pH alcalino (Castro; Pereira, 2010).

Na década de 80, as celulases começaram a ser produzidas em escala industrial para a nutrição animal, aumentando a digestibilidade. Seu uso se estendeu à indústria alimentícia e de bebidas, promovendo a clarificação de sucos. Houve uma intensa expansão da aplicação da celulase, sendo aplicada em vários seguimentos industriais (têxtil, papel, lavanderia), e na década de 90, a celulases e hemicelulases representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (Castro; Pereira, 2010).

2.3.1.3 Amilase

A amilase é uma enzima responsável pela hidrólise do amido, o carboidrato mais comum na natureza e é dividida em dois grupos, as endoamilases (α amilase), e as exoamilases. As endoamilases são responsáveis por realizar hidrólises no interior do amido, quebrando as ligações glicosídicas α -1,4 a glicose, maltose e dextrina. As exoamilases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4, ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, dando origem a produtos com baixo peso molecular (Gupta et al., 2003; Zhang; Han; Xiao, 2017).

Podem ser originadas de animais, vegetais e microrganismos. A produção com origem microbiana apresenta como vantagens a capacidade de grande produção e a facilidade na manipulação para a obtenção de enzimas com as características desejadas (Gupta et al., 2003).

Em peixes, o pH ótimo da amilase é variável de acordo com a espécie, mas está entre 6,0 e 9,0, e a temperatura ótima entre 25° e 55°C. Nesses animais não há produção de amilase salivar, sendo a produção restrita ao pâncreas e ao intestino (De Melo Oliveira; De Souza Bezerra, 2011). Devido à termo resistência, amilases produzidas por microrganismos termofílicos têm se destacado industrialmente devido à estabilidade à temperatura e pH (Carvalho et al., 2008).

2.3.1.4 Protease

As proteases compõem um grupo de grandes moléculas enzimáticas, com a função de hidrolisar as proteínas, sendo a sua atividade fundamental para o metabolismo de um organismo, regulando vias fisiológicas. Podem ter origem animal, vegetal ou microbiana (Gurumallesh et al., 2019).

As enzimas de origem microbiana têm vantagens sobre as demais, como menor custo de produção, recurso renovável, possibilidade de produção em larga escala, utilização de enzimas termo resistente, principalmente de bactérias termofílicas do gênero *Bacillus*. Essas bactérias geralmente crescem rapidamente, catalisam reações em temperaturas elevadas, e por consequência, os riscos de contaminação são reduzidos (Nascimento, 2005).

As proteases são utilizadas em diversos setores: comercial, farmacêutico, detergentes, nutrição, químico, têxtil, papéis, entre outros (Chaud; Arruda; Felipe, 2007) e podem ser classificadas em exopeptidases e endopeptidases, de acordo com o seu local de ação. As exopeptidases atuam de duas formas, com a aminopeptidase, clivando a parte terminal amino da proteína, resultando na liberação de dipeptídeo ou tripeptídeo, e a carboxipeptidases, que clivam a parte carboxila da proteína. Funções atribuídas às carboxipeptidases incluem a digestão de moléculas de alimentos e processos de coagulação sanguínea (Gurumallesh et al., 2019).

As endopeptidases atuam no interior das cadeias, nas partes não terminais dos aminoácidos. São classificadas de acordo com o grupo químico responsável pela atividade catalítica, existindo seis classes: proteases de cistina, proteases de serina, proteases de treonina, proteases de ácido glutâmico, proteases de ácido aspártico e metaloproteases (Gurumallesh et al., 2019).

Para condições ótimas de produção de proteases, há diferenças que dependem da fonte utilizada. Segundo Chaud; Arruda; Felipe (2007), as condições

ótimas de crescimento a partir do gênero *Bacillus* estão na faixa de pH de 7,0 a 9,0 e a temperatura de 40° a 70°C.

2.4 Influências imunológicas e ambientais à adição de enzimas

Além de atuar melhorando os processos digestivos dos animais, a inclusão de enzimas também contribui com o estado imunológico dos peixes e com as condições ambientais do sistema de produção.

A maioria das doenças em peixes é considerada oportunista, visto que o ambiente aquático é responsável por possuir uma grande quantidade de microrganismos. O sistema imune dos peixes é regulado por tecido linfóides associados à mucosa (MALT), que são divididos em tecidos linfóides associados à brânquia (GIALT), tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e tecido linfático associado à pele (SALT). Como a exposição do ambiente aquático com as mucosas é contínua, torna o animal susceptível, as células imunocompetentes e os fatores nas superfícies mucosas, juntamente com a microbiota comensal, têm papel fundamental contra patógenos (Lazado; Caipang, 2014).

O estresse influencia diretamente os animais, tornando-os susceptíveis à doenças, alterando as respostas inatas e contribuindo para o aparecimento de doenças e a alta mortalidade. Apesar de os agentes estressores serem inevitáveis na piscicultura, o uso de probióticos têm sido descritos como agentes que melhoram a tolerância ao estresse em peixes (Akhter et al., 2015).

O uso de probióticos, prebióticos e/ou simbióticos tem sido amplamente usado na aquicultura, devido as características imunoestimulantes (Sado; Bicudo, 2012). Os efeitos do uso são a competição por sítios de adesão; produção de compostos antagonistas contra os patógenos; resistência à colonização e competição por nutrientes essenciais (Nakandakare et al., 2013). Segundo Brown (2011), algumas bactérias utilizadas como probióticos, como o *Bacillus cereus*, são capazes de interromper o *quorum sensing* de bactérias patogênicas por intermédio da secreção enzimática.

Diversos estudos têm associado a presença de doenças com a microbiota intestinal. A presença de microrganismos comensais podem atuar como importante imunomoduladores, interferindo na resposta inflamatória. Assim, a aplicação de probióticos é considerada uma alternativa viável e sustentável no controle de doenças (Lazado; Caipang, 2014; Wu; Ivanova; Orekhov, 2020).

Resíduos alimentares e fezes estão entre as principais fontes de poluentes da água, e os elementos como fósforo e nitrogênio desempenham um papel crucial, devido ao fato de serem causadores de eutrofização na água (Cyrino et al., 2010). Na piscicultura, a alimentação com excesso de proteínas pode resultar em um catabolismo de aminoácidos com excreção de amônia, sendo um componente tóxico para os animais.

A amônia pode estar presente sob duas formas na água, NH_3 , que é a forma não ionizada e NH_4 , a amônia ionizada. O aumento do pH da água faz com que aumente as concentrações de NH_3 , considerada entre as duas a mais tóxicas para os animais aquáticos (Correia, 2011).

Apesar de ser um nutriente essencial para a estrutura e processos fisiológicos dos peixes, níveis altos em dietas causam um aumento em sua excreção, levando a eutrofização do meio e ao super florescimento de algas, que podem causar toxidez aos animais (Lazzari; Baldisserotto, 2018). A fim de reduzir os impactos ambientais, é necessária a adoção de técnicas de manejo que possam contribuir com uma melhor digestibilidade e absorção dos nutrientes, como a adição de fitase e protease.

2.5 *Bacillus* sp. SMIA-2

O gênero *Bacillus*, uma das cepas bacterianas mais abundantes encontradas no solo, produz substâncias antimicrobianas, incluindo antibióticos peptídicos e lipopeptídicos e bacteriocinas (Abriouel et al., 2010; Ordóñez et al., 2014). A produção de uma ampla gama de sistemas enzimáticos hidrolíticos, a produção de metabólitos que têm efeitos antagônicos em outros microrganismos, bem como sua capacidade de formar esporos extremamente resistentes, permitem que as espécies de *Bacillus* sobrevivam em diferentes ecossistemas (Lee et al., 2016; Wiegand et al., 2013; Amin et al., 2015; Latorre et al., 2016). Além disso, esse gênero tem um histórico de uso seguro na indústria alimentícia e farmacêutica.

Bacillus sp. SMIA-2, é uma bactéria formadora de esporos, termofílica, gram-positiva e aeróbica estrita que foi isolada no solo na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, por Nunes e Martins (2001). As células deste organismo são Gram-positivas, móveis e medem 1,2 μm de largura e 5,3 μm de comprimento. Os esporos foram subterminais a terminais, de forma elipsoidal (Figura 1). O crescimento ocorre a valores de pH variando de 6,5 a 9,0 e o

crescimento ótimo ocorre em torno de pH 7,0. A temperatura ótima de crescimento é em torno de 55°C e a máxima de 70°C.

Os resultados da comparação de seqüências de 16SrRNA indicaram que o isolado foi proximamente relacionado com o *Bacillus caldxylolyticus* e *Bacillus* sp. AK1 e estes três organismos exibiram níveis de homologia de 94% nas seqüências de DNA ribossomal. Recentemente, Bernardo et al., (2020) re-sequenciou o gene 16S rRNA e mostrou que o grau de semelhança entre o *Bacillus* SMIA-2 e a espécie relacionada mais próxima, *Bacillus licheniformis* Gibson 46T, foi de 100%.

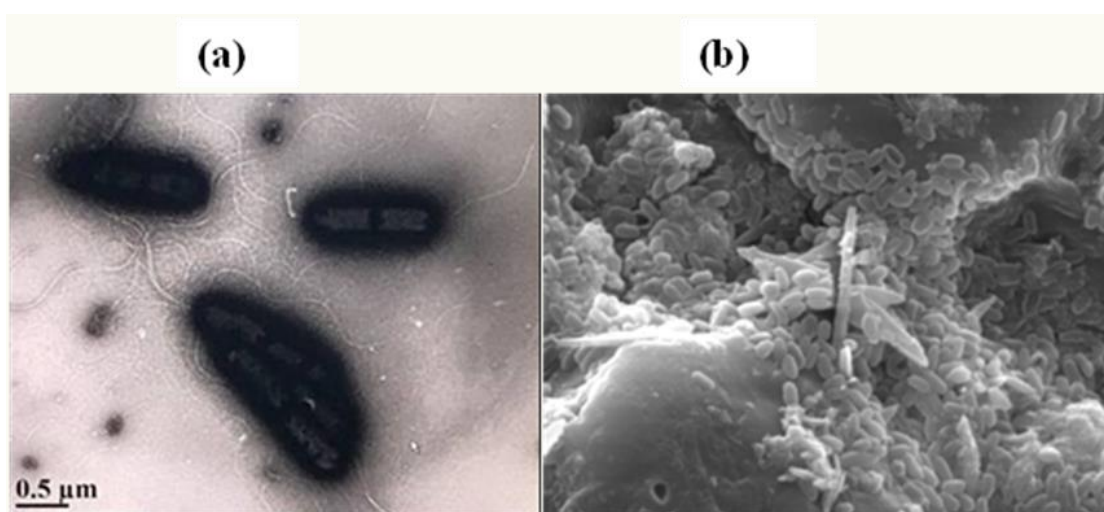


Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células flageladas e endosporo elipsoidal de *Bacillus* sp. SMIA-2 (a) e células de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivadas no bagaço de cana de açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho a 50°C por 72 horas (b). (Custodio, 2020; Cruz, 2017).

Bacillus sp. SMIA-2, produziu níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Barbosa et al., 2014), amilases (Côrrea et al., 2011) e celulasas (Ladeira et al., 2015, Costa et al., 2017), quando cultivada em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais como substratos. A maioria dos estudos sobre a produção de enzimas pelo SMIA-2 concentrou em estudos fisiológicos para melhorar a produtividade das enzimas por meio da manipulação de parâmetros físico-químicos e nutricionais e na determinação de algumas de suas propriedades. Os estudos resultaram no desenvolvimento de meios de culturas constituídos de resíduos agroindustriais para a produção das enzimas, abrindo perspectivas tanto para utilização desta cepa

como de subprodutos agrícolas para formular novos meios de cultura industrial, combinando proteção ambiental com processos sustentáveis para redução do custo de produção.

Com o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de genoma de alto rendimento, os métodos para pesquisa de metabólitos secundários, como a análise de antibióticos e de metabólitos secundários (antiSMASH) podem identificar rapidamente o genoma, anotar e analisar clusters de genes biossintéticos (CGBs) de metabólitos secundários e ajudar a estimar os tipos de compostos codificados pelos clusters de genes (Li et al., 2021). Neste contexto, Bernardo et al., (2020) mostrou que a análise do genoma do SMIA-2 usando antiSMASH mostrou 5 grupos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários. Segundo esses autores, foram detectados 3 clusters de genes pertencentes à síntese de peptídeos não ribossomais (NRPs) (Lichenysin, Fengycin, Bacillibactin) e dois clusters de genes pertencentes à síntese de peptídeos ribossômicos (Lichenicidin and Lasso peptide).

As informações obtidas a partir da análise genômica do SMIA-2 incentivaram Bernardo (2020) investigar a atividade antimicrobiana dessa bactéria contra microrganismos patogênicos. Entre os microrganismos testados, *Staphylococcus aureus* e *S. pseudointermedius* foram os mais sensíveis. *S. aureus* é um patógeno que causa várias doenças humanas com risco de morte (Lin; Peterson, 2010) e *S. pseudointermedius* é um importante colonizador e patógeno de cães, gatos e outros animais domésticos e selvagens (Bourguignon et al., 2016).

A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA, 2019) publicou recentemente (Portaria nº 171), a proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento animal, baseada nas recomendações de órgãos internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido à possível influência na saúde humana. O uso dos antibióticos como aditivos nas rações tem gerado discussões em setores ligados à saúde no mundo inteiro, e tem conseguido sensibilizar a opinião pública quanto aos prováveis problemas gerados pelo uso de antibióticos em rações animais, o que incentiva a restrições pelo mercado consumidor, quanto aos produtos originados a partir de sistemas de criação, que ainda utilizam antibióticos na alimentação animal (Albino et al., 2006). Desta forma, esforços vêm sendo feitos para desenvolvimento de alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento, para atender novos nichos de mercado. Uma das alternativas que

vem sendo estudada para substituir os antibióticos de forma eficiente, é a adição de probióticos em rações.

Probióticos são definidos como microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas que promovem benefícios à saúde do hospedeiro, favorecendo no equilíbrio microbiano intestinal (Saad, 2006). Microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais utilizados como probióticos. No entanto, os *Bacillus* têm sido amplamente empregados como suplementos dietéticos para humanos, como promotores de crescimento e agentes de exclusão competitiva em animais e como agentes de exclusão competitiva e promotores de crescimento em aquicultura (Cutting, 2011), devido às propriedades fornecidas pelos seus esporos, como melhor viabilidade no trato gastrointestinal, devido à maior resistência dos esporos aos sucos gástrico e biliar e necessidade de menor dose efetiva para ser usada como probiótico, por meio da capacidade de sobrevivência de *Bacillus* probióticos (Durkee, 2010).

Apesar de alguns probióticos serem capazes de produzir substâncias antimicrobianas nem todos são capazes de produzir enzimas que melhoram a disponibilidade de nutrientes no lúmen intestinal. Portanto, a associação de probióticos e de enzimas exógenas é uma alternativa promissora na alimentação animal, uma vez que os efeitos dos probióticos poderão ser potencializados.

3. TRABALHOS

3.1 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, MICROBIOTA E HISTOMORFOMETRIA INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DO *BACILLUS* SP. SMIA-2

RESUMO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é um peixe de grande importância econômica na cadeia produtiva brasileira, tendo uma demanda crescente em sua produção, particularmente em criações intensivas em sistemas do tipo tanques-rede. Entretanto, o confinamento de elevadas biomassas de peixes, pode levar a perdas no desempenho zootécnico e a maior vulnerabilidade a agentes patogênicos oportunistas. Além disso, intensificar o cultivo significa aumentar a quantidade de biomassa produzida por área, o que eleva os gastos com a alimentação. Desta forma o uso de ingredientes mais baratos, que forneçam resultados satisfatórios é de grande interesse. Bactérias do gênero *Bacillus* têm se destacado como um dos

grupos mais promissores capazes de promoverem melhorias no desempenho destes animais. A introdução de enzimas em rações, como as proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, também pode melhorar o desempenho de peixes, uma vez que melhoram o aproveitamento dos ingredientes das rações. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas como aditivos para rações em peixes, avaliando-se as características zootécnicas, a microbiota intestinal e a análise das vilosidades intestinais. A adição do *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrou eficiência nos fatores avaliados, contribuindo com maior ganho de peso final e maior altura das vilosidades intestinais, garantindo assim uma maior capacidade absorptiva.

Palavras-chave: microbiologia intestinal. nutrição de peixes, probióticos, prebióticos.

ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a fish of great economic importance in the Brazilian production chain, with a growing demand for its production, particularly in intensive creations in net-tank systems. However, confinement of high fish biomass can lead to losses in zootechnical performance and greater vulnerability to opportunistic pathogens. In addition, intensifying cultivation means increasing the amount of biomass produced per area, which increases food costs. Therefore, the use of cheaper ingredients that provide satisfactory results is of great interest. Bacteria of the genus *Bacillus* have stood out as one of the most promising groups capable of promoting improvements in the performance of these animals. The introduction of enzymes in feeds, such as proteases produced by bacteria of the genus *Bacillus*, can also improve fish performance, since they improve the use of feed ingredients. The objective of this work was to evaluate the potential of *Bacillus* sp. SMIA-2 and its enzymes as additives for fish feeds, evaluating zootechnical characteristics, intestinal microbiota and analysis of intestinal villi. The addition of *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrated efficiency in the evaluated factors, contributing to greater final weight gain and greater height of intestinal villi, thus ensuring greater absorptive capacity.

Keywords: intestinal microbiology. fish nutrition, probiotics, prebiotics.

INTRODUÇÃO

O uso de enzimas exógenas adicionadas às rações tem como objetivo minimizar ou remover alguns fatores antinutricionais, melhorar o valor nutricional (digestão e absorção de nutrientes), reduzir a excreção de fósforo e nitrogênio, reduzindo os impactos ambientais (Cyrino et al., 2010; Gomes et al., 2016). Dessa forma, a adição de enzimas digestivas na piscicultura é necessária para aumentar a absorção de nutrientes, diminuir os impactos ambientais e consequentemente os custos de produção (Tachibana et al., 2010; Santos, 2017).

A Instrução Normativa n°.13 de 30 de novembro de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define como aditivo para produtos destinados à alimentação animal como “substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais”.

Apesar de promissor, o uso de enzimas exógenas na aquicultura ainda requer muitos ensaios. Dessa forma, a adição de enzimas exógenas na aquicultura pode ser uma alternativa ao uso de alguns nutrientes, diminuindo a contaminação ambiental. Os estudos disponíveis utilizam uma infinidade de espécies de peixes, com diferentes hábitos alimentares, além de dietas diversas em níveis de inclusão de aditivos. Além disso, muitas publicações utilizam associações entre prebióticos e probióticos, complexos enzimáticos, dificultando o entendimento dos mecanismos de ação de cada componente na fisiologia animal, tornando a comparação entre os estudos ainda uma incógnita.

Bacillus sp. SMIA-2 é uma bactéria Gram-positiva aeróbia, termofílica, formadora de esporos, não patogênica, isolada no início dos anos 2000 por Nunes e Martins (2001). O SMIA-2 tem sido amplamente estudado para a produção de enzimas termoestáveis como amilases (Côrrea et al., 2011; Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b), pectinases (Andrade et al., 2011), celulases (Oliveira et al.,

2014; Ladeira et al., 2015; Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019) e especialmente proteases (Nascimento et al., 2004; Nascimento et al., 2006a; Nascimento et al., 2006b; Nascimento et al., 2007; Silva et al., 2007, Ladeira et al., 2010; Barbosa et al., 2014).

Bernardo et al., (2020) sequenciou todo o genoma do *Bacillus* sp. SMIA-2 e relatou que a bactéria abriga genes que codificam três peptídeos não ribossômicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários, que apresentaram 100% de identidade com liquenisinas, 53% com fengicinas e 46% com bacilibactina, quando comparados com outros clusters conhecidos. Todos eles foram relatados como compostos com potente atividade antimicrobiana (Dischinger et al., 2009). Além disso, de acordo com esses autores, as atividades enzimáticas termoestáveis de SMIA-2 foram apoiadas por inventários de genes, incluindo seis genes de amilase; 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteínas e três loci de celulases (por exemplo, endoglucanase) sob um complexo de celulosoma putativo.

Apesar de muitos estudos realizados sobre a produção de enzimas pelo SMIA-2, nenhum deles avaliou seu uso como bactéria probiótica na alimentação de peixes. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os diferentes níveis de inclusão de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas no desenvolvimento zootécnico e na morfometria intestinal de juvenis de tilápia.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalações e condições experimentais

Todos os procedimentos com animais para pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética para experimentação e uso de animais em pesquisa do Instituto Federal do Espírito Santo, registrado sob o número 23149.001859/2021-56 (Anexo 1).

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição e Produção de Peixes Ornamentais do Ifes – Campus de Alegre no período entre os meses de março e maio de 2021, com 45 dias de duração.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições, com 15 juvenis em cada, totalizando 25 unidades experimentais (U.E). As U.E. foram compostas de 15 juvenis mais o aquário, com volume útil de 50 litros.

- a) T1 – Ração controle, sem inclusão do simbióticos;
- b) T2 – Ração com 0,383g de inclusão de simbiótico por quilo de ração;
- c) T3 – Ração com 0,765g de inclusão de simbiótico por quilo de ração;
- d) T4 - Ração com 1,147g de inclusão de simbiótico por quilo de ração;
- e) T5 – Ração com 1,1531g de inclusão de simbiótico por quilo de ração.

As U.E. possuíam recirculação de água, entradas e saídas de águas individualizadas por U.E., filtros, com filtragem física, química e biológica e a caixa de retorno, com motobomba de 3/4cv e aquecedores com termostatos (Figura 2). A cada três dias, as U.E. eram sifonadas para realização de troca parcial da água (TPA) de aproximadamente 20% do volume útil das U.E.



Figura 2: Unidades experimentais no LNPEO – Ifes – Campus de Alegre

Para controle e acompanhamento da qualidade da água nos sistemas experimentais foram avaliados os seguintes parâmetros de qualidade da água: oxigênio dissolvido (O₂D) e temperatura da água máxima, mínima e da hora (T[°]CM_x, T[°]CM_n e T[°]CH_{rs}), por meio de oxímetro e termômetro digitais. Os valores

de pH e condutividade foram mensurados por meio de peagâmetro e condutímetro digitais e amônia, nitrito e nitrato, com fotocolorímetro digital microprocessado, ambos a cada 2 dias. Todos os aparelhos citados são foram calibrados antes de cada medição.

Animais

Após o período de adaptação, os alevinos de tilápia foram selecionados de acordo com biometria inicial, medido com paquímetro (Figuras 3 e 4), comprimento total, comprimento padrão e altura, além de pesados em balança digital com 4 casas decimais e três de precisão. Todos os peixes foram sedados com 0,25mL de eugenol por litro de água. Os peixes possuíam média de peso inicial de 0,7034 g e média de comprimento total 3,685 cm. Após biometria inicial, os peixes foram distribuídos uniformemente nas UE.



Figura 3: Medição, por meio de paquímetro, do comprimento total do animal.



Figura 4: Medição, com o auxílio de um paquímetro, da altura do animal.

Dietas

As rações experimentais utilizadas foram formuladas para juvenis de tilápia com 36% de proteína bruta (PB) e 3100Kcal de energia digestível (ED) (cada tratamento recebeu a mesma ração basal, porém com o acréscimo do simbiótico em diferentes níveis.

Para a formulação da ração, os ingredientes foram moídos e misturados nas devidas proporções (Tabela 1). Após mistura, os ingredientes foram umedecidos, com água a 55°C, e misturados, para somente depois serem peletizados. Após a peletização, os mesmos foram secos ao ar livre e à sombra, e devidamente armazenados em geladeira ou freezer, para o uso durante o experimento. O aditivo foi adicionado à ração de forma “on top”.

Tabela 1: Composição basal da ração fornecida nas dietas dos peixes.

COMPONENTES	PROPORÇÃO
Farelo de soja	49,2%
Milho	26,8%
Farinha de peixe	20,5%
Óleo de soja	3,5%

O arraçoamento foi realizado diariamente até saciedade dos peixes, divididos em três refeições.

Bacillus sp. SMIA e suas enzimas

O produto simbiótico utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e consistiu de esporos de *Bacillus sp. SMIA-2* (7.3 log esporos/mL) e suas enzimas (U.mL⁻¹): 11.46 proteases, 1.10 avicelases, 0.30 xilanases, 0.29 amilases, 0.23 poligalacturonases, 0.13 carboxymethylcellulases.

Desempenho zootécnico

Para biometria final do experimento, os animais foram eutanasiados em cumprimento às Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA para peixes ósseos e cartilagosos, utilizando o eugenol, na dose de 5 mL/litro de água.

As variáveis utilizadas para quantificar o desenvolvimento dos alevinos foram: peso, comprimento total, comprimento padrão, altura, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, fator de condição, taxa de eficiência proteica, taxa de eficiência energética, taxa de sobrevivência e uniformidade do lote.

•Ganho de Peso: $GP = Pf - Pi$ (g).

Pf = peso médio final (g) e Pi = peso médio inicial (g).

•Consumo de Ração: CR (g) no período = (Ração fornecida – Sobra de ração) / número de animais.

•Conversão Alimentar Aparente: $CAA = CR / GP$.

•Taxa de Crescimento Específico: $TCE = ((\ln Pf - \ln Pi)) / Tta) \times 100$.

Ta= período de alimentação (dias).

•Fator de Condição: $K = (P \times 100) / C^3$.

P= peso (g), e C= comprimento (cm).

•Taxa de Sobrevivência: $TS = (Nf / Ni) \times 100$.

Nf = número final de peixes e Ni= número inicial de peixes/ unidade experimental.

•Taxa de Eficiência Proteica: $TEP = (GP / (CR \times \%PB \text{ da dieta})) \times 100$.

GP= ganho de peso e CR consumo de ração.

•Taxa de Eficiência Energética: $TEE = (GP / (CR \times \%PB \text{ da dieta})) \times 100$.

GP= ganho de peso e CR consumo de ração.

- Índice Hepatosomático: $HIS = (P_{Fig}/P_F, \text{ em gramas}) \times 100$

Após quantificada e tabuladas todas as variáveis, a normalidade dos dados foi feita pelo teste de Shapiro-Wilks, e após constatada normalidade, os dados referentes ao crescimento, sobrevivência e variáveis histológicas foram analisados seguindo procedimento de ANOVA (One Way) e posterior análise de regressão.

Exames histopatológicos

No processamento das análises das vilosidades intestinais, foram retirados fragmentos biológicos (Figuras 5 e 6) com cerca de 3 cm de comprimento e 5 mm de espessura, em corte transversal, em dois diferentes segmentos do intestino um terço e segundo terço (duodeno e íleo), para estudo da morfologia e integridade das estruturas.



Figura 5: Retirada das vísceras, para pesagem e medição

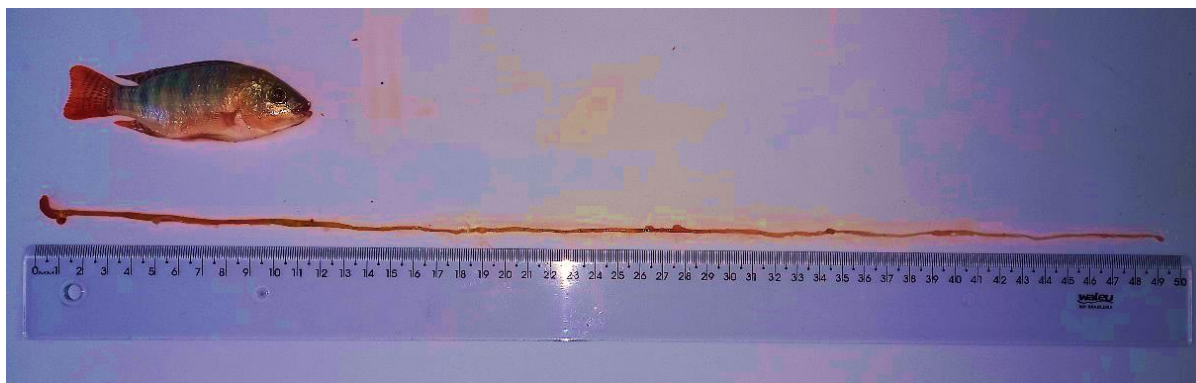


Figura 6: Medição do intestino dos animais, antes de ser seccionado em 3 porções para fixação em formal a 10%.

Amostras de intestino foram fixadas em formalina a 10 %, neutra e tamponada, sendo conservadas até o seu processamento. Foi realizada a clivagem e os fragmentos foram colocados em cassetes histológicos para a técnica de inclusão em parafina. O processamento consiste nas seguintes etapas: amostras foram desidratadas em séries de concentrações crescentes de álcoois (70, 85, 95%, álcoois absolutos I, II e III) durante uma hora, em cada. Finalizada a etapa de desidratação as amostras passaram pelo processo de clarificação em xilol I, II e II, onde permaneceram por uma hora, em cada, e em seguida imerso em parafina I e posteriormente II, também por 1 hora, em cada.

Logo após esses procedimentos, as amostras foram emblocadas com parafina de inclusão misturada com cera de abelha, sendo então armazenadas em congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 7). Os blocos foram desbastados com o auxílio de micrótomo em cortes transversais de $4\text{ }\mu\text{m}$ de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, e observadas em microscópio de luz. Foram observados e medidos com ocular micrométrica as seguintes variáveis: profundidade de cripta, altura e largura de vilosidade e relação largura x altura de vilosidades.



Figura 7: Emblocamento das amostras de fragmentos intestinais

Recuperação das bactérias no intestino

Após a eutanásia, os peixes foram descontaminados externamente com álcool 70%, por imersão em recipiente de vidro por cinco minutos. Os intestinos foram retirados, pesados e macerados em tubos de ensaio previamente esterilizados (Figura 7) e utilizados para posteriores diluições seriadas, em água peptonada a 0,1% (p/v) com imediata semeadura de 0,1mL da solução em superfície de meio de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA) (Jatobá et al., 2008).

Para a contagem de bactérias heterotróficas totais, as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48 horas para a posterior contagem das colônias as quais foram expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

Para a enumeração dos esporos e de células viáveis as amostras foram submetidas à etapa de choque térmico (80°C / 10 min) (Rabinovitch & Oliveira, 2015) em banho-maria e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Em seguida, diluições em série foram realizadas usando água peptonada a 0,1% (p/v) e semeadas em placas contendo meio TSA. As placas foram incubadas a 50°C por 48 horas para posterior contagem das colônias. Os resultados das contagens obtidas foram expressos como número de esporos por mililitro.



Figura 8: Intestinos de animais do processo de maceração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem bacteriana e de esporos no intestino

Nos peixes do tratamento controle, não se detectou o crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 nas placas, demonstrando que não houve contaminação dos aquários e da ração e, que a bactéria não estava presente no sistema. Nos tratamentos nos quais foram adicionados os esporos e enzimas do SMIA-2 às dietas, foi possível recuperar os esporos presentes nos intestinos, sendo que as contagens foram mais altas para os tratamentos T3 e T4, que apresentaram valores de $1,3 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ respectivamente, pós 45 dias de alimentação dos peixes. Estes resultados indicaram a viabilidade do *Bacillus* sp. SMIA-2 como probiótico. Em um estudo com pós-larvas de tilápia alimentadas com ração contendo 5 e 10 g.kg⁻¹ de *Bacillus subtilis*, foram recuperadas $1,15 \times 10^4$ e $4,74 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ bactérias do intestino (Tachibana et al., 2011).

Em relação à contagem de bactérias heterotróficas totais no intestino, a carga microbiana foi maior para o tratamento controle e diminuiu à medida que o número de esporos do *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas aumentaram. Posteriormente, com a diminuição do número de esporos, a contagem de bactérias heterotróficas totais no intestino aumentou. Estes resultados sugerem que a inclusão dos esporos do SMIA-2 e de suas enzimas na ração pode ter modificado a composição bacteriana intestinal. No entanto, mais estudos são necessários para determinar o perfil da microbiota intestinal encontrada neste estudo, para verificar seu potencial para reduzir o risco de surtos de doenças durante a fase de cultivo da

tilápia, por exemplo. Segundo Tachibana et al., (2020), a inclusão de 0,04% e 0,08% de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, respectivamente em dietas para tilápia do Nilo reduziu significativamente o potencial de colonização de bactérias patogênicas (por exemplo, *Acinetobacter* sp.) ao mesmo tempo que favoreceu a colonização de bactérias benéficas (por exemplo, *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. e *Cetobacterium* sp.).

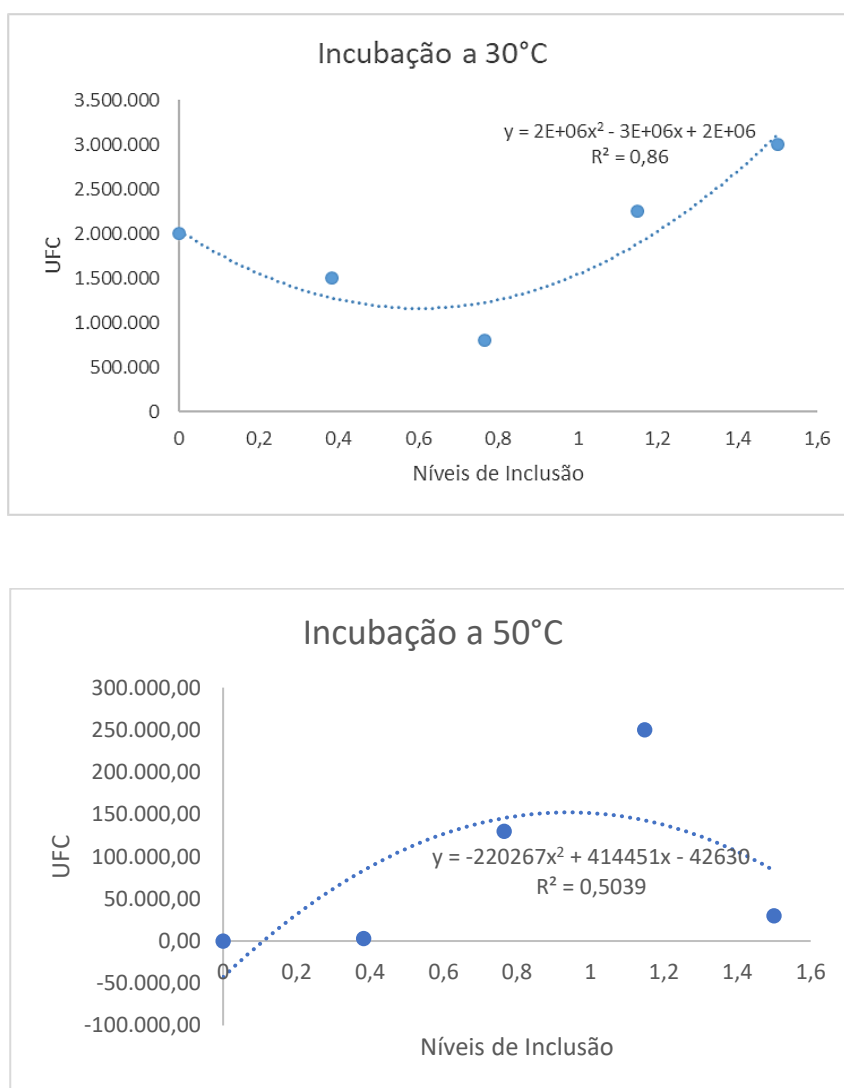


Figura 9: Efeito de diferentes níveis de inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 e de suas enzimas sobre o número de bactérias heterotróficas totais (a) e de esporos recuperados no intestino das tilápias (b).

Adicionalmente, confeccionou-se lâminas das culturas dos plaqueamentos de ambas as temperaturas, sendo coradas com corante rápido tipo Panótico® e

observadas em objetiva de 60x. As lâminas provenientes das placas submetidas a incubação a 30°C possuíam diferentes morfologias de microrganismos (Figura 10). Já as lâminas provenientes de placas que sofreram o tratamento térmico a 80°C e que tiveram a incubação a 50°C apresentaram colônias mais uniformes e com bacilos maiores, além de esporos (Figura 11).

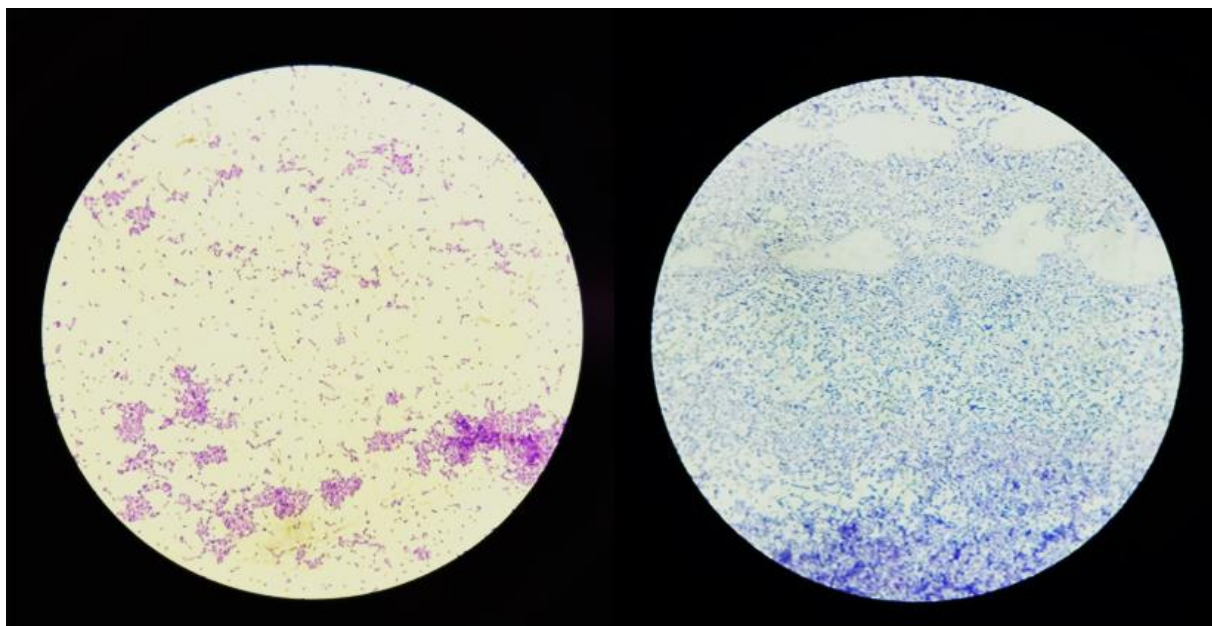


Figura 10: Diferentes morfologias de microrganismos isolados de intestino de juvenis de tilápia após inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 à ração, submetidos a tratamento térmico de 30°C.

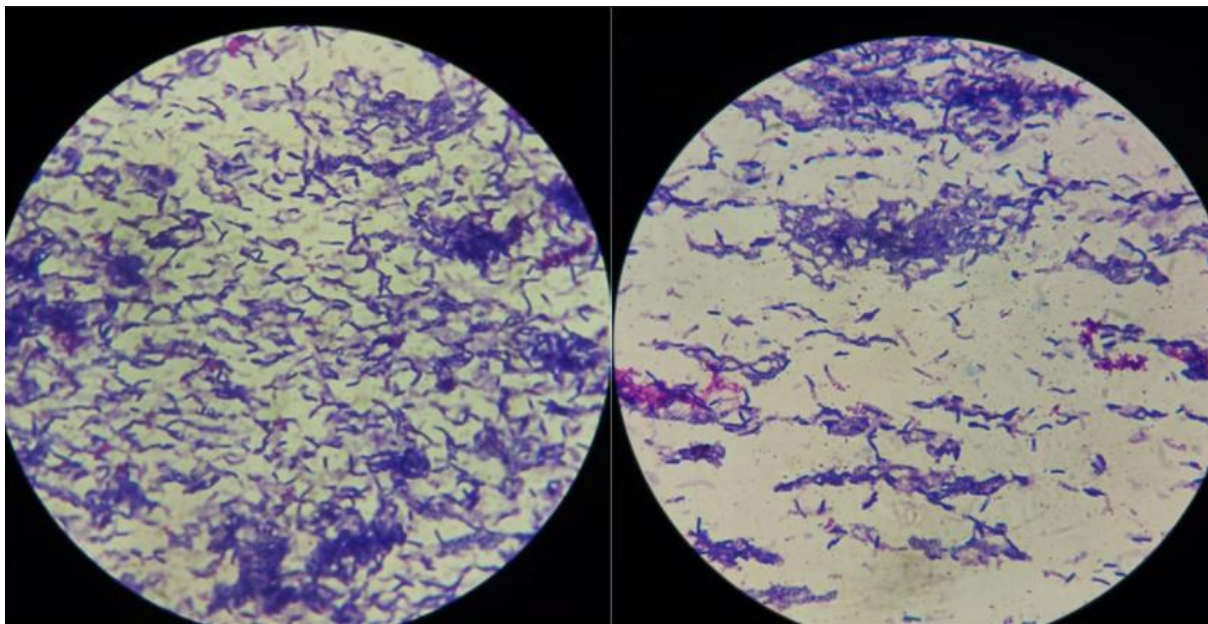


Figura 11: Bacilos e esporos de bacilos isolados de intestino de juvenis de tilápia após inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 à ração, submetidos a incubação de 50°C.

A visualização das lâminas indica que houve colonização e esporulação do *Bacillus* sp. SMIA-2 no trato intestinal de juvenis de tilápia. Possivelmente houve um crescimento dos bacilos e estes competiram por sítios de ação das demais bactérias intestinais, diminuindo a contagem do número total de bactérias e posteriormente elevando esse número, por posterior colonização bacteriana.

Qualidade da água

As medias dos parâmetros da qualidade mensurados durante o período experimental foram: temperatura – 26,77°C; oxigênio dissolvido – 3,207 mg/L; amônia 0,062 mg/L e potencial hidrogeniônico (pH) – 8,055.

O monitoramento da qualidade da água é essencial para a produtividade aquícola, mesmo em criações de espécies que apresentam maior rusticidade, como a tilápia. Segundo Duarte et al (2014), as tilápias apresentam conforto térmico quando a temperatura está entre 27 e 32°C. Temperaturas elevadas (acima de 38°C) pode levar a uma mortalidade dos animais por diminuir a concentração de oxigênio dissolvido na água. Quando a temperatura é baixa, há uma queda da resistência e o animal fica susceptível às enfermidades, além de níveis aumentados de cortisol (Falcon et al., 2008).

Apesar de o oxigênio dissolvido estar abaixo do recomendado para a maioria das espécies, entre 5 e 6 mg/L, a tilápia é capaz de tolerar baixas

concentrações. Duarte et al (2014) afirmam que esses animais são capazes de suportar níveis de oxigênio entre 0,4 e 0,7 mg/L, mas pode haver comprometimento no desempenho.

Os níveis elevados de amônia podem afetar a o processo de osmorregulação, a excreção e o transporte de oxigênio, sendo recomendado níveis inferiores a 0,24 mg/L (Duarte et al., 2014), estando o trabalho dentro dos padrões recomendados.

A média do pH se manteve dentro dos parâmetros recomendados para a espécie, que é entre 6,0 e 8,5 (Kubitza, 2000). As principais razões nas alterações do pH são a respiração, adubação, calagem, fotossíntese e poluição. Faixas de pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 causa um estresse nos animais, podendo resultar na morte (Duarte et al., 2014).

Desempenho animal

Entre as variáveis analisadas estatisticamente, as que apresentaram significância foram: peso final (PF), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA) (Tabela 2), consumo de ração individual (CRI), taxa de sobrevivência (SOB), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência protéica (TEP), peso de vísceras (PV), CI e QI (Tabela 3).

Tabela 2: Valor médio das variáveis em juvenis de tilápia alimentados com diferentes níveis de inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2.

NÍVEIS DE INCLUSÃO DO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 (g.kg ⁻¹ de ração)	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO		
	PF (g)	GP (g)	CA
Controle	19,656	18,952	1,237
0,383	23,859	23,156	1,121
0,765	19,380	18,678	1,339
1,147	20,305	19,601	1,186
1,153	20,687	19,984	1,209

Os animais obtiveram resultados estatisticamente semelhantes em todos os parâmetros descritos na tabela, quando comparados ao tratamento controle: peso final, ganho de peso e conversão alimentar, desejável em animais destinados à produção. Como a tilápia é a espécie mais consumida no Brasil, é desejável que possua uma boa taxa de conversão alimentar. Assim, para os parâmetros

descritos na Tabela 2, não houve diferenças entre o tratamento controle os diferentes níveis de inclusão.

Tabela 3: Valor médio das variáveis de peso de fígado, peso de vísceras, índice hepato- somático e índice viscero-somático em juvenis de tilápia alimentados com diferentes níveis de inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2.

NÍVEIS DE INCLUSÃO DO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 (g.kg ⁻¹ de ração)	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO			
	PFig (g)	PV (g)	IHS	IVS
Controle	0,392ab	1,436abc	1,998ab	7,379a
0,383	0,362ab	1,666a	1,572ab	7,101a
0,765	0,242b	1,094c	1,253b	5,729a
1,147	0,408a	1,558ab	2,039a	7,701a
1,153	0,255ab	1,232bc	1,240b	5,969a

Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância. Peso de fígado (PF), peso de vísceras (PV), índice hepato-somático (IHS) e índice viscero-somático (IVS).

O fígado dos peixes também exerce um papel essencial ao sistema imune, e diversos fatores (uso de antimicrobianos, estresse, resíduos industriais) podem causar efeitos deletérios na função hepática, comprometendo a resposta imune inata (Moraes et al., 2018). Também possui como função o armazenamento e estocagem de gordura e glicogênio, para períodos de escassez de alimentos e são fundamentais para os processos metabólicos e desintoxicação. Uma das causas do aumento no tamanho do órgão pode ser resultado de uma alimentação pobre em proteína e rica em carboidratos e gordura, resultando em uma coloração marrom amarelada (Kubitza; Guimarães; Kubitza, 2000).

Porém, ao exame macroscópico no final do período experimental, o fígado dos animais apresentou coloração normal e boa integridade. Como a ração fornecida aos animais foi igual nos cinco tratamentos, pode-se descartar que o aumento do fígado seja resultante da qualidade da ração. Dessa forma, o aumento do peso do fígado pode ser resultante do aumento das reservas energéticas do animal. Assim, esse aumento pode ser benéfico, pois as reservas apresentam um importante papel como fonte de glicose aos animais no período pré e pós prandial (Da Silveira; Logato; Da Conceição Pontes, 2009).

Dessa forma, a inclusão de $1,147 \text{ g.kg}^{-1}$ de ração de *Bacillus* sp. SMIA-2 obteve uma melhor resposta em relação à essa variável. Porém, apesar de ser um fator fisiológico para reserve energética, ao avaliar as variáveis IHP, PV e IVS, percebe-se que o nível de inclusão a $1,147 \text{ g.kg}^{-1}$ de ração também apresentou uma maior resposta, em comparação aos demais tratamentos.

O IVS é um fator que afeta a produção de peixes. Um aumento na deposição de gordura nas vísceras pode resultar na redução do valor comercial dos peixes (Wang et al., 2016). Sendo a tilápia uma espécie que apresenta ampla popularidade e o segundo peixe mais cultivado mundialmente (Islam; Rohani; Shahjahan, 2021), é desejável que haja o máximo de aproveitamento do animal.

Segundo Moraes et al (2021), os resíduos do processamento pesqueiro (cabeça, vísceras, pele e espinha dorsal) podem representar 62,5% do peso do animal, podendo causar contaminação ambiental. Assim, quanto menor o peso de vísceras, maior será o aproveitamento do animal.

Dessa forma, diante dos resultados obtidos com diferentes níveis de inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2, torna-se necessária a realização de novos estudos com inclusões a níveis intermediários, a fim de obter respostas mais específicas.

Análises Histomorfométricas

A análise estatística revelou que a altura das vilosidades decresce de acordo com os níveis crescentes da inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2, conforme demonstrado na Figura 12.

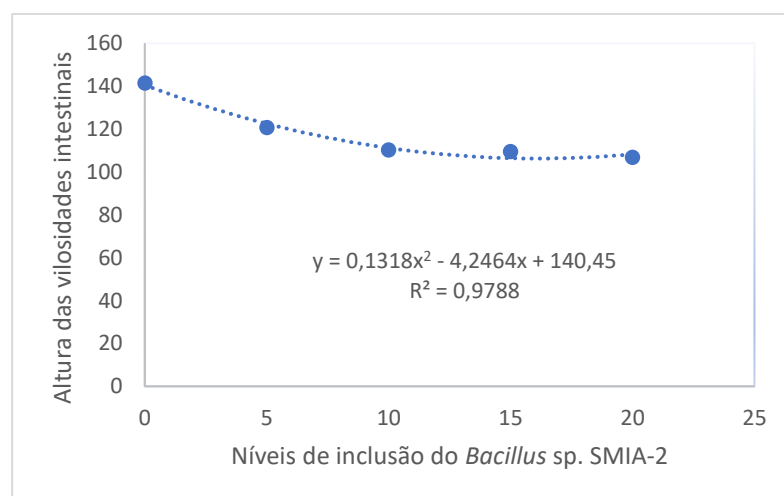


Figura 12: Altura das vilosidades intestinais de peixes submetidos à adição em diferentes níveis de inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2.

A ração sem adição do simbiótico (controle) apresentou maior altura das vilosidades intestinais. Resultado semelhante foi descrito por Cechim et al (2013), quando aos 60 dias de experimento com adição de prebiótico mananoligossacarídeo (MOS) no nível de 4,0 g.kg⁻¹ de inclusão em tilápias, observou diminuição na altura das vilosidades intestinais, quando comparados aos peixes controle.

Autores afirmam que, quando as condições ambientais e de sanidade são favoráveis, o uso de probióticos pode não apresentar efeitos (Lima et al., 2003), e sendo a tilápia um animal com rusticidade e facilidade de adaptação, a ação do aditivo pode ser mascarada (Cechim et al., 2013).

CONCLUSÃO

Considerando que este estudo com o *Bacillus* sp. SMIA-2 na alimentação de juvenis de tilápia é inaugural, o mesmo apresenta efeito promissor na alimentação animal, visto que dentre os parâmetros de desempenho animal avaliados, houve uma resposta benéfica, devendo-se apenas ajustar a dose para um maior desempenho animal.

A colonização intestinal por esporos de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostrou-se eficaz pela contagem de colônias e visualização microscópica, sendo necessária a realização de mais ensaios.

REFERÊNCIAS

Andrade, M. V. V. (2011) Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Impresso)*, v. 31, p. 204-208.

- Barbosa, J. B. et al., (2014) Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalysis and Biotransformation* (Print), v. 32, p. 244-250.
- Bernardo, S. P. C. (2020) Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus* licheniformis SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*, v. 9, p. 1, 2020.
- Carvalho, R. V. de. (2008a) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp... *Brazilian Journal of Microbiology* (Impresso), v. 39, p. 102-107.
- Carvalho, R. V. de (2008b) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 380-386.
- Cechim, F. E. et al., (2013) Características morfológicas do epitélio intestinal e desempenho de Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, suplementada com mananoligossacarídeo (MOS). Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Corrêa, T. L. R. et al., (2011) Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp.. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: Compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (Impresso), v. 31, p. 34-40.
- Costa, E. A. et al., (2017) Sugarcane Bagasse and Passion Fruit Rind Flour as Substrates for Cellulase Production by *Bacillus* sp. SMIA-2 Strain Isolated from Brazilian Soil. *Journal Of Microbiology And Biotechnology* (Online), v. 2, p. 1-8.
- Cruz, E. et al., (2019) Stability cellulases of *Bacillus* sp. SMIA-2 during storage under freezing and in the presence of additives. *Revista Geintec: Gestão, Inovação E Tecnologias*, v. 9, p. 4740.
- Cyrino, J. E. P. et al., (2010) A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 68-87.

- Da Silveira, U. S.; Logato, P. V.; Da Conceição Pontes, E. (2009) Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 6, n. 1, p. 817-836.
- Dischinger, J. et al., (2009) Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS One*, v. 4, n. 8, p. e6788.
- Duarte, E. et al., (2014) Parâmetros físico-químicos da água para cultivo de tilápia do Nilo em sistemas de biofiltros.
- Falcon, D. R. et al., (2008) Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina ce lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 543-551.
- Gomes, V. D. S. et al., (2019) Suplementação enzimática sobre desempenho e taxa de excreção de amônia em Tilápia do nilo. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 22, n. 1.
- Islam, S. M. M.; Rohani, M. F.; Shahjahan, M. (2021) Probiotic yeast enhances growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through morphological modifications of intestine. *Aquaculture Reports*, v. 21, p. 100800.
- Jatoba, A. et al., (2008). Lactic-acid bactéria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 43, 1201–1207. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900015>.
- Kubitza, F. (2000) Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí.
- Kubitza, L. M. M, Guimarães, T. G., Kubitza, F. Monitorando a saúde dos peixes. <https://panoramadaaquicultura.com.br/monitorando-a-saude-dos-peixes/>
Acesso em 24/06/2021.
- Ladeira, S. A. et al., (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 324-328.
- Ladeira, S. A. et al., (2015) Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp.. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 110-115.
- Lima, A.C.F.; Pizauro Júnior, J.M.; Macari, M. (2003) Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.1, p.200-207.

- Moraes, A. C. et al., (2018) Esteatose hepática altera acúmulo celular em tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, p. 1570-1576.
- Nascimento, W. C. A. et al., (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp... *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 35, p. 91-96.
- Nascimento, W. C. A. do et al., (2007) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 417-421, 2007.
- Nunes, A. ; Martins, M. L. L. (2001) Isolation, Properties and Kinetics of Growth of a Thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology* (Impresso), Brasil, v. 32, p. 271-275.
- Santos, F. W. B. (2017) Nutrição de peixes de água doce: definições, perspectivas e avanços científicos. In: I Simposio de nutrição e alimentação animal, Fortaleza. [http://www.higieneanimal.ufc.br/anais/anaisb/aa24_2.pdf]. Reviewed.
- Silva, C. R. et al., (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 253-258.
- Tachibana, L. et al., (2010) Xylanase and beta-glucanase on nutrient apparent digestibility of triticale by Nile tilapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 2, p. 445-452.
- Tachibana, L.; Dias, D.C.; Ishikawa, C.M.; Correa, C.F.; Leonardo, A.F.G.; Ranzani-Paiva, M.J.T. (2011) Probiótico na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758): desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos*, 25(1): 25-31.
- Wang, L. et al., (2016) Effect of dietary lipid on growth performance, body composition, plasma biochemical parameters and liver fatty acids content of juvenile yellow drum *Nibea albiflora*. *Aquaculture reports*, v. 4, p. 10-16.

3.2 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SIMBIÓTICOS NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E MORFOLOGIA INTESTINAL DE JUVENIS TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) possui um destaque na cadeia produtiva brasileira, tendo uma demanda crescente em sua produção, particularmente em criações intensivas em sistemas do tipo tanques-rede. Porém, devido à alta densidade de confinamento, pode haver a perdas no desempenho zootécnico e a maior vulnerabilidade a agentes patogênicos oportunistas, com redução da imunidade. Além disso, intensificar o cultivo significa aumentar a quantidade de biomassa produzida por área, elevando os gastos com a alimentação. Desta forma o uso de ingredientes mais baratos, que forneçam resultados satisfatórios é de grande interesse. Bactérias do gênero *Bacillus* têm se destacado como um dos grupos mais promissores capazes de promover melhorias no desempenho destes animais. A adição de enzimas às rações, como as proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, também pode melhorar o desempenho de peixes, uma vez que podem potencializar o aproveitamento

dos ingredientes das rações. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas como aditivos para rações em peixes, comparativamente com produtos comerciais e em diferentes níveis de inclusão. A adição do *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrou eficiência no desempenho animal, contribuindo com maior ganho de peso final e maior altura das vilosidades intestinais, garantindo uma maior capacidade absorptiva.

Palavras-chave: aquicultura, nutrição animal, *Oreochromis niloticus*, prebiótico, probiótico.

ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) stands out in the Brazilian production chain, with a growing demand for its production, particularly in intensive creations in net-tank systems. However, due to the high density of confinement, there may be losses in zootechnical performance and greater vulnerability to opportunistic pathogens, with reduced immunity. In addition, intensifying cultivation means increasing the amount of biomass produced per area, increasing food costs. Therefore, the use of cheaper ingredients that provide satisfactory results is of great interest. Bacteria of the genus *Bacillus* have been highlighted as one of the most promising groups capable of promoting improvements in the performance of these animals. The addition of enzymes to feeds, such as proteases produced by *Bacillus* bacteria, can also improve fish performance, as they can enhance the use of feed ingredients. The objective of this work was to evaluate the potential of *Bacillus* sp. SMIA-2 and its enzymes as fish feed additives compared to commercial products and at different inclusion levels. The addition of *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrated efficiency in animal performance, contributing to greater final weight gain and greater height of intestinal villi, ensuring greater absorptive capacity.

Keywords: aquaculture, animal nutrition, *Oreochromis niloticus*, prebiotic, probiotic.

INTRODUÇÃO

O agronegócio é de fundamental importância para a economia brasileira. Conforme dados do Ministério da Agricultura, o agronegócio, em 2017, participou com 23 a 24% do Produto Interno Bruto (PIB). O aumento acumulado foi de mais de 30% nos últimos dez anos. Esse crescimento só foi possível graças ao desenvolvimento tecnológico (Sidonio et al., 2012; Brasil, 2017). Além da grande quantidade de terras, o Brasil é o maior reservatório de água doce do planeta, com mais de 8 mil km³, muito superior à do segundo colocado, a Rússia, com cerca de 4,5 mil km³ (Sidonio et al., 2012). Assim, o Brasil destaca-se pelo grande potencial para a aquicultura, pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética. Porém, mesmo com tantos atributos favoráveis, o Brasil ainda possui muitas condições para desenvolver seu potencial produtivo para a aquicultura (Rocha et al., 2013).

Apesar de o Brasil estar muito aquém de seu potencial produtivo, segundo estimativas do MPA e da FAO, a produção pode atingir até vinte milhões de toneladas anuais, atendendo não apenas o consumo interno, mas também uma demanda externa crescente. Projeções da FAO apontam que, até 2030, a demanda por pescados no mundo deve crescer em quarenta milhões de toneladas (Sidonio et al., 2012).

De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), a aquicultura é uma atividade definida como o cultivo de organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas, envolvendo o cultivo de água doce e de água salgada em organismos sob condições controladas (SEBRAE, 2015).

Os produtos oriundos da aquicultura destacam-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal por possuírem, comparativamente, grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, minerais, cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo. As proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais para o ser humano e, assim como as proteínas do leite, do ovo e de carnes de mamíferos, têm elevado valor biológico (Oliveira Sartor; Amancio, 2012).

A fim de otimizar o desenvolvimento da aquicultura, além de se obter informações que possibilitem a formulação de dietas que atendam às exigências das espécies com potencial zootécnico, faz-se necessário o estudo de técnicas de

processamento que visem proporcionar melhor aproveitamento dos nutrientes das dietas, proporcionando a redução de custos de produção e um menor impacto ao meio ambiente (Polese et al., 2010).

Prebióticos são compostos não digeríveis por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo, mas seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal. Podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem incluídos por meio de fontes exógenas concentradas (Gibson; Roberfroid, 1995). Os probióticos são suplementos alimentares que contêm bactérias vivas benéficas ao hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal, tendo boas perspectivas para o uso na piscicultura, como alternativa na profilaxia de doenças e redução da utilização de antibióticos. Os simbióticos são associações entre prebióticos e probióticos, com o potencial de possibilitar uma maior sobrevivência de uma bactéria prebiótica no trato gastrointestinal (Cavagnari et al., 2019).

Além de aprimorarem as condições intestinais para os processos de digestão e absorção de nutrientes (Busanello, 2012), outras características importantes são atribuídas ao uso de simbióticos, podendo-se destacar a resistência à acidez gástrica, resistência aos sais biliares, modulação na resposta imune, adesão ao tecido do trato gastrointestinal, segurança de uso comprovada, garantia de manutenção da viabilidade até o consumo, independentemente do veículo utilizado (Sturmer et al., 2012).

Os mecanismos de ação são: exclusão competitiva (ou competição por sítios de ação), estimulação do sistema imunológico, efeito nutricional e produção de substâncias antibacterianas e enzimas (Busanello, 2012). Para que haja a ocorrência desses efeitos benéficos no hospedeiro, as bactérias devem sobreviver, colonizar e persistir no trato gastrointestinal. Os esporos de *Bacillus* podem germinar no trato, exercendo seus efeitos benéficos no organismo do hospedeiro, como a secreção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) e/ou pela competição por nutrientes com bactérias patogênicas (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018). A produção de substâncias antimicrobianas e a capacidade de esporulação faz com que o uso de cepas de *Bacillus* seja vantajosa, pois são capazes de sobreviver em diferentes habitats e a sua presença em alimentos não implica necessariamente na deterioração ou em intoxicação alimentar, podendo ser usada na alimentação humana e animal (Abriouel et al., 2011).

Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar o desempenho zootécnico em juvenis de tilápia utilizando dois produtos comerciais utilizados na produção animal e do *Bacillus* sp. SMIA-2.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais – LNPEO, no Campus de Alegre-ES, durante 45 dias, entre março e maio de 2021, sendo aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação e Uso de Animais em Pesquisa do Instituto Federal do Espírito Santo, registrado sob o número 23149.001859/2021-56

Consistiu na comparação dos resultados no desempenho zootécnico decorrente da ação de simbióticos disponíveis comercialmente como aditivos para animais, com o *Bacillus* sp. SMIA-2.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos:

- a) Tratamento 1 (T1): ração controle;
- b) Tratamento 2 (T2): ração com inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 e enzimas;
- c) Tratamento 3 (T3): ração com o produto comercial A - *Bacillus licheniformis* e enzimas (0,250 g.kg⁻¹);
- d) Tratamento 4 (T4): ração com o produto comercial B - *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e enzimas ((0,100 g.kg⁻¹).

O *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizado nesse experimento foi isolada no solo na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, por Nunes e Martins (2001), e foi fornecido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

As doses dos produtos comerciais seguiram as recomendações dos fabricantes, e a dose de inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 foi de 0,765 g.kg⁻¹.

Cada tratamento foi constituído de seis repetições, com 15 juvenis de tilápia em cada um, totalizando 24 unidades experimentais (U.E) (Figura 13), com o volume de 50 litros. As U.E. possuem recirculação de água, entradas e saídas de águas individualizadas por U.E., filtros, com filtragem física, química e biológica e a caixa de retorno, com motobomba de 3/4cv e aquecedores com termostatos. A cada 3 dias as U.E. foram sifonadas para realização de troca parcial da água (TPA) de aproximadamente 20% do volume útil.



Figura 13: Unidades experimentais – LNPEO/Ifes – Campus de Alegre

O fornecimento da ração foi realizado três vezes ao dia, até saciedade dos peixes. As rações experimentais utilizadas foram formuladas para juvenis de tilápia com 36% de proteína bruta (PB) e 3100Kcal de energia digestível (ED) (cada tratamento recebeu a mesma ração basal, porém com o acréscimo do *Bacillus* sp. SMIA – 2, em diferentes níveis).

Para a formulação da ração, os ingredientes foram moídos e misturados nas devidas proporções (Tabela 4). Após mistura, os ingredientes foram umedecidos, com água a 55°C, e misturados, para somente depois serem peletizados. Após a peletização os mesmos foram secos ao ar livre e à sombra, e devidamente armazenados em geladeira ou freezer, para o uso durante o experimento. O aditivo foi adicionado à ração de forma “on top”.

Tabela 4: Composição basal da ração fornecida nas dietas dos peixes.

COMPONENTES	PROPORÇÃO
Farelo de soja	49,2%
Milho	26,8%
Farinha de peixe	20,5%
Óleo de soja	3,5%

Após o período de adaptação, os alevinos de tilápia foram selecionados de acordo com biometria inicial, medido com paquímetro (Figuras 14 e 15), comprimento total, comprimento padrão e altura, além de pesados em balança digital com 4 casas decimais e três de precisão. Todos os peixes foram sedados com 0,25mL de eugenol por litro de água. Os peixes possuíam média de peso inicial de 1,14 g e média de comprimento total 4,32 cm. Após biometria inicial, os peixes foram distribuídos uniformemente nas UE.

**Figura 14:** Biometria com o auxílio de um paquímetro.



Figura 154: Biometria de altura do animal, com o auxílio de um paquímetro.

Para controle e acompanhamento da qualidade da água nos sistemas experimentais foram mensurados os seguintes parâmetros de qualidade da água: Oxigênio dissolvido (O_2D) e temperatura da água máxima, mínima e da hora ($T^{\circ}CMx$, $T^{\circ}CMn$ e $T^{\circ}CHrs$), foram mensurados diariamente, através de oxímetro e termômetro digitais. Os valores de pH e condutividade foram mensurados por meio de peagâmetro e condutivímetro digitais e amônia, nitrito e nitrato, com fotocolorímetro digital microprocessado, ambos a cada 2 dias. Todos os aparelhos citados são foram calibrados antes de cada medição.

As variáveis utilizadas para quantificar o desenvolvimento dos alevinos são: peso, comprimento total, comprimento padrão, altura, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, Fator de Condição, taxa de eficiência proteica, taxa de eficiência energética, taxa de sobrevivência e uniformidade do lote.

- Ganho de Peso: $GP = Pf - Pi$ (g). Pf = peso médio final (g) e Pi = peso médio inicial (g).
- Consumo de Ração: CR (g) no período = (Ração fornecida – Sobra de ração) / número de animais.
- Conversão Alimentar Aparente: $CAA = CR / GP$.
- Taxa de Crescimento Específico: $TCE = ((\ln Pf - \ln Pi)) / Tta) \times 100$. Ta= período de alimentação (dias).
- Fator de Condição: $K = (P \times 100) / C^3$. P= peso (g), e C= comprimento (cm).

- Taxa de Sobrevivência: $TS = (N_f / N_i) \times 100$. N_f = número final de peixes e N_i = número inicial de peixes/ unidade experimental.
- Taxa de Eficiência Proteica: $TEP = (GP / (CR \times \%PB \text{ da dieta})) \times 100$. GP= ganho de peso e CR consumo de ração.
- Taxa de Eficiência Energética: $TEE = (GP / (CR \times \%PB \text{ da dieta})) \times 100$. GP= ganho de peso e CR consumo de ração.

Para biometria final do experimento, os animais foram eutanasiados em cumprimento às Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA para peixes ósseos e cartilagosos, utilizando o eugenol, na dose de 5 mL/litro de água. No processamento das análises das vilosidades intestinais, foram retirados fragmentos biológicos (Figuras 16 e 17) com cerca de 3 cm de comprimento e 5 mm de espessura, em corte transversal, em dois diferentes segmentos do intestino um terço e segundo terço (duodeno e íleo), para estudo da morfologia e integridade das estruturas.



Figura 16: Retirada das vísceras, para pesagem e medição.

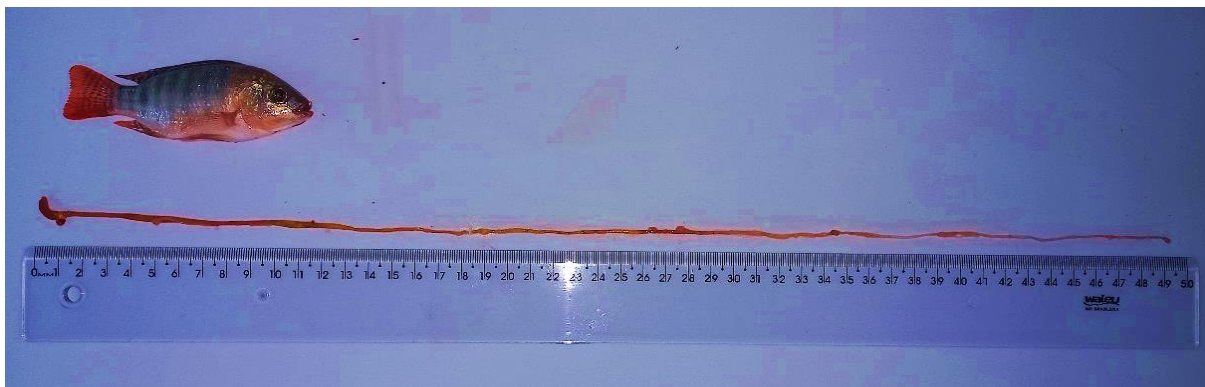


Figura 17: Medição do intestino dos animais, antes de ser seccionado em 3 porções para fixação em formal 10%.

Amostras de intestino foram fixadas em formalina a 10 %, neutra e tamponada, sendo conservadas até o seu processamento. Foi realizada a clivagem e os fragmentos foram colocados em cassetes histológicos para a técnica de inclusão em parafina. processamento consiste nas seguintes etapas: amostras foram desidratadas em séries de concentrações crescentes de álcoois (70, 85, 95%, álcoois absolutos I, II e III) durante uma hora, em cada. Finalizada a etapa de desidratação as amostras passaram pelo processo de clarificação em xilol I, II e II, onde permaneceram por uma hora, em cada, e em seguida imerso em parafina I e posteriormente II, também por 1 hora, em cada.

Logo após esses procedimentos, as amostras foram emblocadas com parafina de inclusão misturada com cera de abelha, sendo então armazenadas em congelador a -20 °C (Figura 18). Os blocos serão desbastados com o auxílio de micrótomo em cortes transversais de 4 μ m de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, e observadas em microscópio de luz. Foram observados e medidos com ocular micrométrica as alturas de vilosidades (Figura 19).

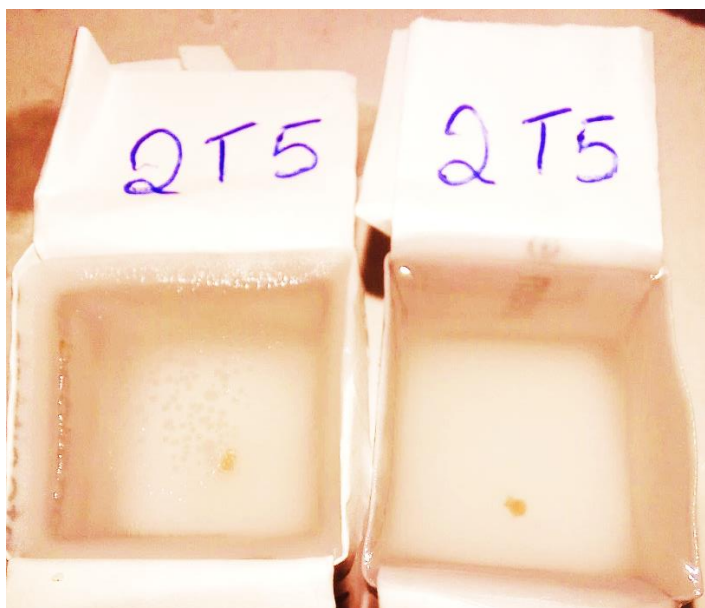


Figura 18: Processo de emblocamento das amostras de fragmentos intestinais de juvenis de tilápia.



Figura 19: Fotomicrografia do intestino dos peixes, com mensuração da altura da vilosidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Qualidade da água

As médias dos parâmetros da qualidade mensurados durante o período experimental foram: temperatura – 26,94°C; oxigênio dissolvido – 3,87 mg/L; amônia 0,00205 mg/L e potencial hidrogeniônico (pH) – 6,93.

A temperatura tem uma fundamental importância para organismos aquáticos em cultivo, uma vez que podem influenciar o metabolismo dos animais (Coelho et al., 2014). Nesse experimento, a temperatura manteve-se dentro dos parâmetros recomendados para a espécie.

Os níveis de oxigênio dissolvido obtidos estão abaixo do recomendado para o cultivo de tilápias. Porém, alguns autores afirmam que essa espécie é muito resistente às baixas concentrações de oxigênio dissolvido, (1,2 mg/L) (Ferreira et al., 2011).

Devido a seu grande potencial de toxicidade, é desejável que o nível de amônia se mantenha em baixas concentrações (Gomes et al., 2019), com recomendação inferior a 0,24mg/L (Duarte et al., 2014), estando esse experimento dentro dos padrões indicados.

A média do pH se manteve dentro dos parâmetros recomendados para a espécie, que é entre 6,0 e 8,5 (Kubitza, 2000). Segundo Lemos (2017), pH inferior a 5,0 pode resultar em distúrbios regulatórios, com diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio; e pH alcalino pode levar a um aumento do NH₃ no sistema.

Desempenho animal

Entre as variáveis analisadas estatisticamente, as que apresentaram significância foram: peso final (PF), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA) (Tabela 4), consumo de ração individual (CRI), taxa de sobrevivência (SOB), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência protéica (TEP), peso de vísceras (PV), CI e QI (Tabela 5).

Os resultados do estudo demonstram um efeito satisfatório quando há adição de simbióticos no consumo de ração individual, peso final e ganho de peso. Apesar de a conversão alimentar aparente não apresentar diferenças significativas entre os tratamentos, os grupos que receberam simbióticos apresentaram melhor resposta nessas características de desempenho.

Esses resultados corroboram com diversos trabalhos publicados que utilizam bactérias probióticas na mesma espécie (Cornélio et al., 2013; Hisano et

al., 2007; Pezzato et al., 2006). Partindo do princípio de que um dos mecanismos de ação é a competição por absorção, a inclusão dos simbióticos pode ter evitado a colonização de bactérias nocivas, resultando em uma melhor eficiência na absorção dos nutrientes.

Tabela 5: Valor médio das variáveis em juvenis de tilápia com a adição de diferentes simbióticos comerciais e o *Bacillus* sp. SMIA-2.

TRATAMENTOS	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO			
	CRI (g)	PF (g)	GP (g)	CAA
Controle	26,801b	25,43b	24,29a	1,10a
SMIA-2	35,617a	35,45a	34,31a	1,04a
Comercial 1	36,653a	35,39a	34,25a	1,07a
Comercial 2	36,315a	36,28a	35,15b	1,03a

Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância. Consumo de ração individual (CRI), peso final (PF), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA).

Conforme descrito por Marengoni et al., (2010), o uso probióticos podem diminuir os custos de produção, uma vez que os microrganismos podem ser capazes de realizar a decomposição de macronutrientes, transformando-os em compostos mais simples, resultando em um melhor aproveitamento do alimento.

Apesar de o uso de bactérias do gênero *Bacillus* na aquicultura estar relacionado a bons índices de sobrevivência, nesse experimento o percentual de sobrevivência com o uso do *Bacillus* sp. SMIA-2 foi baixa, quando comparado aos tratamentos com os simbióticos comerciais.

Alguns autores descrevem que para que o uso de aditivos possa expressar seus efeitos faz-se necessário haver desafios, como agentes estressores, má qualidade da água, altas densidades de estocagem ou doenças no cultivo (Silva et al., 2021), por exemplo. Marengoni et al., (2010) ressaltam que nem sempre é possível evidenciar os efeitos positivos do uso de aditivos, uma vez que eles podem ser dependentes dos ingredientes da dieta, do nível de estresse dos animais e das características de cada produto.

Tabela 6: Valor médio das variáveis de desempenho em juvenis de tilápia com a adição de diferentes simbióticos comerciais e o *Bacillus* sp. SMIA-2.

TRATAMENTOS	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO					
	SOB (%)	TCE (%)	TEP (%)	PV	CI	QI
Controle	64ab	6,716b	2,5109a	1,1416b	47,60b	5,8458b
SMIA-2	42b	7,472a	2,6749a	2,0204ab	44,80b	5,6325b
Comercial 1	82a	7,457a	2,5909a	2,6609a	58,20a	7,3616a
Comercial 2	76a	7,529a	2,6881a	2,6798a	57,74a	7,2167a

Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância. Consumo de ração individual (CRI), taxa de sobrevivência (SOB), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência protéica (TPE), peso de vísceras (PV), comprimento do intestino (CI) e coeficiente intestinal (CI).

A taxa de crescimento específico (TCE) e a taxa de eficiência proteica (TEP) apresentaram resultados semelhantes nos grupos tratados com a adição de simbióticos. Dessa forma, o *Bacillus* sp. SMIA-2 equipara-se aos produtos comerciais como um aditivo promotor de crescimento, quando comparado ao grupo controle. Alguns autores destacam que a TCE é diretamente proporcional às condições sanitárias do meio (Merengoni et al., 2010). Nesse estudo, os indicadores de qualidade de água permaneceram de acordo dos limites recomendáveis para a espécie, evitando o comprometimento das atividades fisiológicas normais dos animais.

A TEP demonstra que nos tratamentos em que houve adição dos produtos comerciais e do *Bacillus* sp. SMIA-2, ocorreu uma eficiência na utilização da proteína pelos peixes. Dessa forma, a inclusão à ração pode ter influenciado a sua utilização no metabolismo desses animais.

Vale ressaltar que os principais resíduos da excreção dos peixes são o fósforo e os compostos nitrogenados, que em quantidades excessivas podem levar à uma degradação do ambiente de cultivo, resultando em uma má qualidade da água (Macedo; Sipaúba-Tavares, 2018). Dessa forma, o uso de aditivos à ração pode aumentar a digestibilidade e um melhor aproveitamento desses nutrientes, evitando o acúmulo de nutrientes na água (Gomes et al., 2016).

O peso das vísceras (fígado, vesícula biliar, estômago, pâncreas e intestino) (PV) foi maior nos produtos comerciais, mas em peixes que utilizaram a adição de *Bacillus* sp. SMIA-2 esse valor foi maior que o grupo controle.

Porém, quando o animal é destinado ao consumo, o rendimento do filé é dependente de vários fatores, dentre eles está a porcentagem de resíduos. Nesse aspecto, quanto menor for o peso visceral, de nadadeiras, pele e cabeça do animal, maior será o rendimento do animal (De Moraes Gonçalves; De Almeida; Santo Borges, 2003).

Sendo a tilápia a espécie mais cultivada no Brasil, é desejável que o peso das vísceras seja menor, a fim de obter um rendimento dos filés para consumo. Dessa forma, o uso de *Bacillus* sp. SMIA-2 pode ter uma pequena vantagem quando comparado aos produtos comerciais, ao considerarmos que o PF entre os 3 tratamentos foi estatisticamente semelhante.

O comprimento do intestino (CI) e o coeficiente intestinal (QI) também demonstram uma vantagem do *Bacillus* sp. SMIA-2 em relação aos produtos comerciais e ao grupo controle. Segundo Rotta (2003), o QI de animais onívoros varia de 0,6 a 8,0, e animais com intestinos menores podem possuir dobras ou outras estruturas que podem aumentar a superfície, como por exemplo um maior desenvolvimento dos cecos pilóricos, que aumentam a superfície de absorção sem aumentar o CI.

Assim, quando objetiva-se potencializar o rendimento de filés desses animais, a inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstra uma maior vantagem quando comparada aos produtos comerciais, apesar dos testes ainda serem inaugurais na alimentação de animais aquáticos.

Análises histomorfométricas intestinais

A análise estatística revelou que a altura das vilosidades foi maior com a inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2, conforme demonstrado na Figura 20.

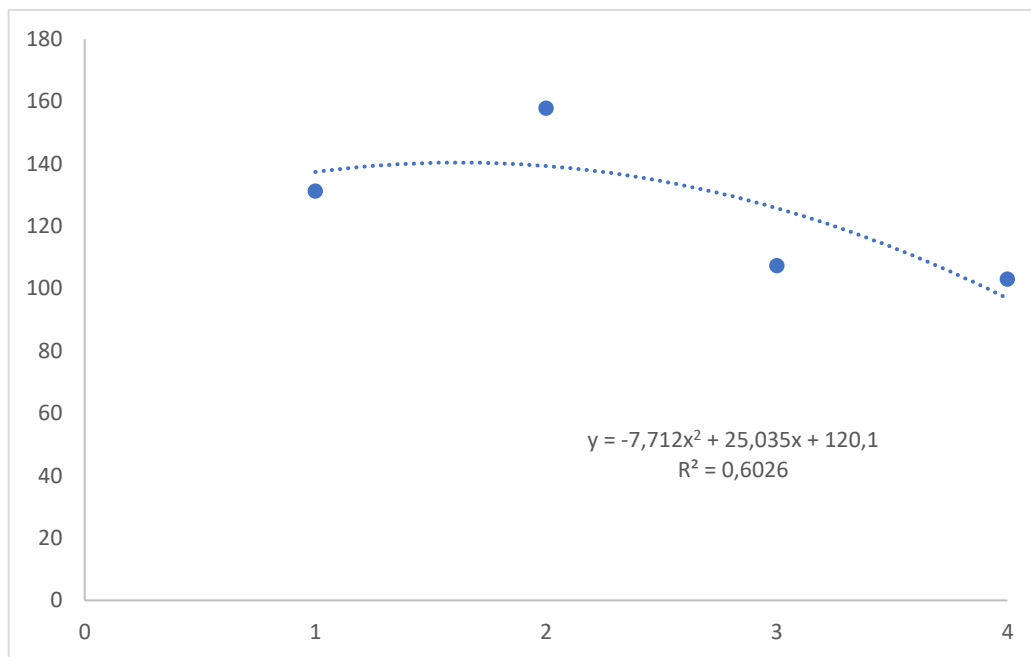


Figura 20: Altura das vilosidades intestinais em peixes. 1 = Controle; 2 = Simbiótico SMIA-2; 3 = Produto comercial 1; 4 = Produto comercial 2.

A inclusão de *Bacillus* sp. SMIA-2 propiciou uma maior altura das vilosidades intestinais (Figura 21), quando comparado aos demais tratamentos. É um resultado promissor na nutrição de peixes, visto que há associação entre a importância das vilosidades intestinais com a nutrição e sanidade dos animais. Assim, quando mais íntegra a mucosa intestinal, maior serão as vilosidades e a capacidade de absorção de nutrientes (Lima, 2014).

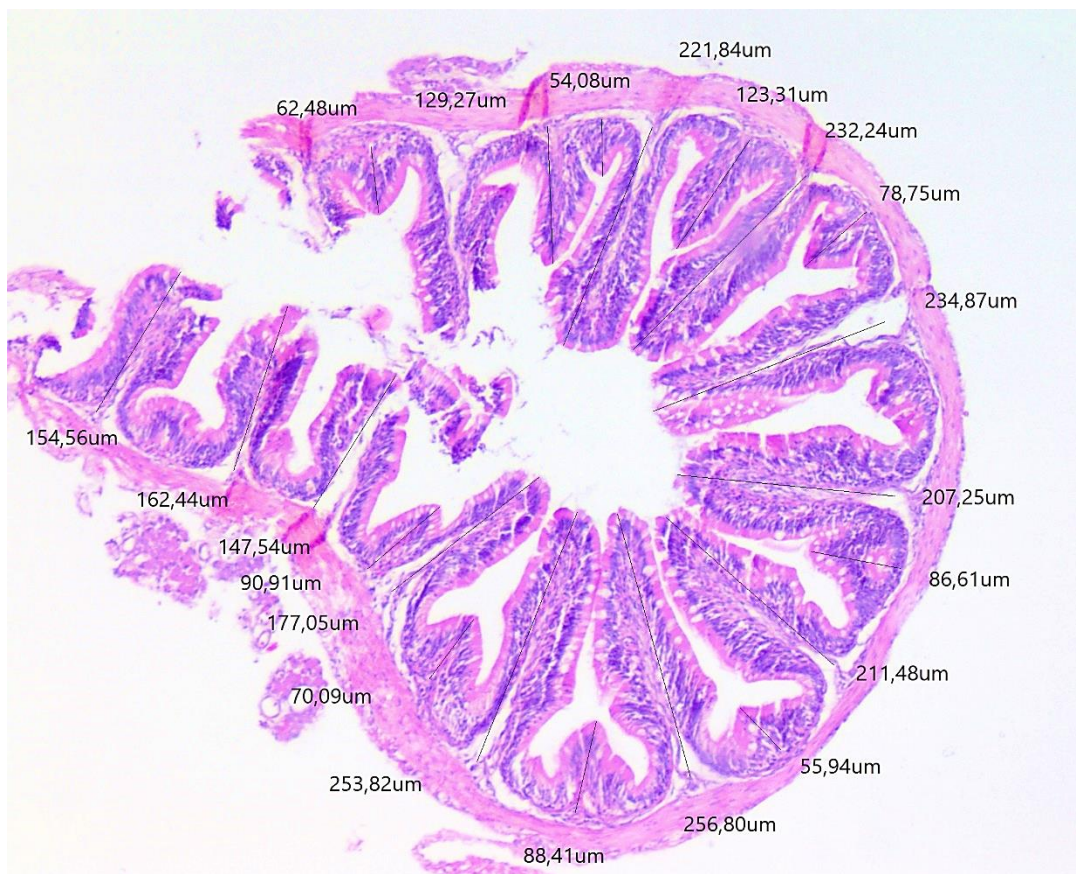


Figura 21: Fotomicrografia de porção intestinal de peixe submetido à inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2, com mensuração da altura das vilosidades.

A adição de microrganismos pode influenciar a microbiota intestinal dos animais, sendo capazes de atuar nas vilosidades. As vilosidades são necessárias à função intestinal, ampliando a superfície, potencializando a absorção de água, íons e nutrientes advindos dos alimentos, tendo um papel fundamental no desempenho e na saúde dos animais, e podem sofrer alterações conforme alterações na dieta (Paiva, 2017; Lima, 2014).

CONCLUSÃO

A inclusão do *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrou grande potencialidade como aditivo para alimentação de peixes, mesmo quando comparado aos produtos comerciais. Demonstrou capacidade de melhorar o desempenho dos animais, e

proporcionou um aumento significativo nas vilosidades intestinais, contribuindo com a absorção de nutrientes e sanidade dos animais.

REFERÊNCIAS

- Abriouel, H. et al., (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews, v. 35. p. 201-232.
- Brasil, 2017. Agropecuária puxa o PIB de 2017. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>> Acesso em 05/02/2018.
- Busanello, M., Pozza, M. S. S., Barros, P. C., Chambo, A. P. S., Eckstein, I. I. (2012) Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. Scientia Agraria Paranaensis Volume 11, número 4, p.14-24.
- Coêlho, A. A. C. et al., (2014) Desempenho zootécnico de alevinos de tilápia do Nilo cultivados em um sistema de recirculação de água com a microalga *Spirulina platensis*. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 15, P. 149-159.
- Cornélio, F. H. G. et al., (2013) Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, p. 863-870.
- De Moraes Gonçalves, T.; De Almeida, A. J. L.; Santo Borges, E. E. (2003) Características de carcaça de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em quatro classes de peso ao abate. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v. 25, n. 1, p. 25-29.
- Duarte, E. et al., (2014) Parâmetros físico-químicos da água para cultivo de tilápia do Nilo em sistemas de biofiltros.
- Ferreira, A. H. C. et al., (2012) Uso de probióticos na aquicultura – Revisão. Artigo 176 - Volume 9 - Número 05 – p. 1965 – 1980 - Setembro/ Outubro.
- Ferreira, P. de M. F. et al., Avaliação do consumo de oxigênio da tilápia do nilo submetidas a diferentes estressores. Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, v. 6, n. 1, p. 56-62, 2011.
- Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, v.125, p.1401-1412.
- Gomes, V. D. S et al., (2016) Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes - revisão de literatura. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 259-264, out./dez.

- Gomes, V. D. S. et al., (2019) Suplementação enzimática sobre desempenho e taxa de excreção de amônia em tilápia do nilo. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 22, n. 1.
- Ilva, A. F. C. et al. (2021) Inclusion of probiotic additives in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effects on performance, hematological, hepatic and intestinal parameters. *Research, Society and Development, [S. l.]*, v. 10, n. 8, p. e38210817568.
- Kubitza, F. (2000) Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí.
- Lemos, C. H. P. (2017) Efeito do pH da água no crescimento e no metabolismo de Tilápia-do-nilo e Pintado amazônico.
- Lima, F. W. (2014) Colonização e morfometria intestinal de lambaris-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* alimentados com dietas contendo levedura *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico. Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Macedo, C. F.; Sipaúba-Tavares, L. H. (2018) Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 36, n. 2, p. 149-163.
- Marengoni, N. G. et al., (2010) Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob à inclusão de probiótico em água mesohalina. *Archivos de Zootecnia*, v. 59, n. 227, p. 403-414.
- Mingmongkolchai S.; Panbangred W. (2018) Probióticos *Bacillus*: uma alternativa aos antibióticos para a produção animal. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, ed. 6, p. 1333-1648.
- Oliveira Sartori, A. G.; Amancio, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança alimentar e nutricional*, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.
- Paiva, N. H. O papel da bifurcação das projeções da mucosa durante a morfogênese das vilosidades intestinais em embriões de galinhas. (2017) 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- Pezzato, L.E et al., (2006) Levedura em dietas para alevinos de tilápia do Nilo. *Veterinária e Zootecnia*, v.13, p.84-94.
- Polese, M. F. et al., (2010) Efeito da granulometria do milho no desempenho de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p.1469-1477.
- Rocha, C. M. C. et al., (2013) Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 48, n. 8, p. iv-vi.
- SEBRAE (2015) EMPRESAS–SEBRAE, Pequenas. *Aquicultura no Brasil: série estudos mercadológicos*.

Sidonio, L. et al., (2012) Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. BNDES setorial, v. 35, p. 421-463.

Sturmer, S. E. et al., (2012) A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v. 27, n. 4, p. 60-68.

CONCLUSÕES

Com o crescente avanço das tecnologias voltadas à nutrição e alimentação animal, o uso de aditivos alimentares mostra-se uma estratégia promissora para contribuir com um maior desempenho animal. A cadeia de produção de animais aquáticos é, atualmente, o que apresenta maior crescimento nos últimos anos e com grandes perspectivas futuras, sendo alvo de inúmeras pesquisas no campo da nutrição.

O uso do *Bacillus sp.* SMIA-2 apresentou uma boa eficiência nas características de desempenho dos peixes quando comparados aos produtos comerciais já disponíveis, resultando em um bom ganho de peso final do animal, diminuição no peso da carcaça (gerando menos resíduos) e uma maior altura das vilosidades intestinais, que possibilita uma melhor capacidade de absorção de nutrientes da dieta.

A adição das bactérias e suas enzimas também resultou em um maior número de esporos de *Bacillus* em inclusões de 0,1 e 0,15%, diminuindo a carga bacteriana total e alterando a flora microbiana intestinal.

Porém, faz-se necessário uma melhor avaliação do nível de inclusão na dieta, visto que conforme o aumento no nível de inclusão, menor era a resposta ao desempenho animal. Mesmo assim, o uso do *Bacillus sp.* SMIA-2 apresentou eficiência, sendo seu uso muito promissor na alimentação de peixes.

REFERÊNCIAS

- Abelha, M. C. F.; Agostinho, A. A.; Goulart. (2018) Plasticidade trófica em peixes de água doce. *Acta Scientiarum* 23(2):425-434.
- Abriouel, H. et al., (2011) Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS microbiology reviews*, v. 35, n. 1, p. 201-232.
- Akhter, N. et al., (2015) Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, v. 45, n. 2, p. 733-741.
- Albino, L. F. T. et al., (2006) Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, p. 742-749.
- Alterthum, F.; Trabulsi, L. R. *Microbiologia* (2015) 6. ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 920p.
- Araujo, E. P. et al., Importância do mineral cobre em dieta de peixes. VIII Simpósio de Ciências da UNESP. 2012.
- Barbosa, J. B. ; Gentil, N. O. ; Ladeira, S. A. ; Martins, M. L. L. (2014) Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalysis and Biotransformation* (Print), v. 32, p. 244-250.
- Baynes, J. W.; Dominiczak, M. H. (2010) *Bioquímica médica*. Elsevier Brasil, 688p.
- Bergamin, G. T. et al., (2013) Extração de antinutrientes e aumento da qualidade nutricional dos farelos de girassol, canola e soja para alimentação de peixes. *Embrapa Pesca e Aquicultura - (ALICE)*. *Ciência Rural*, v. 43, p. 1878-1884.
- Bernardo, S. P. C. et al., (2020) Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial-and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology resource announcements*, v. 9, n. 17, p. e00106-20.
- Bock, C. L.; Pezzato, L. E.; Cantelmo, O. A.; Barros, M. M. (2007) Fitase em rações para tilápido-nilo na fase de crescimento. *R. Brás. Zootec.*, v. 36, n. 5, p.

1455-1461.

- Bottone, E. J. (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 382-398.
- Brandão, L. V. et al., (2018) Influence of phytase addition in diets for tambaqui. *Boletim do Instituto de Pesca*, [S.l.], v. 41, n. 4, p. 1025-1032.
- Brandão, L. V. (2009) Utilização de fitase em dietas para peixes. *PUBVET. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 3, n. 5, p. 10.
- Brasil, 2017. Agropecuária puxa o PIB de 2017. Disponível em: <www.gov.br/agricultura/pt-br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017> Acesso em 05/02/2018.
- Brito, J. M. de. Associação de Xilanase e β -glucanase sobre a digestibilidade, desempenho produtivo, histologia intestinal e microbioma de tilápias do Nilo. 2019.
- Brooks, G. F. et al., (2014) *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26*. AMGH Editora, 874p.
- Brown, M. (2011) Modes of action of probiotics: recent developments. *Journal of animal and veterinary advances*, v. 10, n. 14, p. 1895-1900.
- Busanello, M. (2012) Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 11, n. 4, p. 14-24.
- Campestrini, E.; Silva, V. T. M.; Appelt, M. D. (2005) Utilização de enzimas na alimentação animal. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 2, n. 6, p. 254-267.
- Cardoso, T. A. O.; Vieira, D. N. (2015) *Bacillus anthracis* como ameaça terrorista. *Saúde em Debate*, v. 39, p. 1138-1148.
- Carvalho, R. V. de et al., (2008) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Food Science and Technology*, v. 28, n. 2, p. 380-386.
- Castillo, S.; Gatlin III, D. M. (2015) Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. *Aquaculture*, v. 435, p. 286- 292.
- Castro, A. M. de; Pereira Jr., N. (2010) Produção, propriedades e aplicação de

- celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quimica nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188.
- Chaud, L. C. S.; Arruda, P. V.; Felipe, M. G. A. (2007) Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. *Nucleus*, v. 4, n. 1, p. 1-11.
- Corrêa, T. L. R. et al., (2011) Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: Compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Impresso)*, v. 31, p. 34-40.
- Correia, A. F. M. (2011) Exposição crônica de juvenis de Tilápia do Nilo a nitrogênio amoniacal total em PH da água neutro a moderadamente ácido. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Costa, E. A. et al., (2017) Sugarcane Bagasse and Passion Fruit Rind Flour as Substrates for Cellulase Production by *Bacillus* sp. SMIA-2 Strain Isolated from Brazilian Soil. *Journal Of Microbiology And Biotechnology (Online)*, v. 2, p. 1-8.
- Craig, S. et al., (2017) Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. Publication 420-456. Virginia Cooperative Extension, Yorktown (Virginia).
- Cruz, E. (2017) Estudos sobre a estabilidade de celulases de *Bacillus* sp.. SMIA-2. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.
- Cruz, J. B. F.; Soares, H. F. (2011) Uma revisão sobre o zinco. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 207-222.
- Cutting, S. M. (2011) *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, v. 28, n. 2, p. 214- 220.
- Cyrino, J. E. P. et al., (2010) A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 68-87.
- Dawood, M. A. O.; Koshio, S. (2016) Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquaculture*, v. 454, p. 243-251.

- De Brito, M. S. et al., (2008) Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos–revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, n. 4, p. 111-117.
- De Jesus, T, B.; De Carvalho, C. E. V. (2008) Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia brasiliensis*, v. 12, n. 4, p. 680-693.
- De Melo Oliveira, V.; De Souza Bezerra, R. (2011) Efeito do alumínio na atividade da amilase intestinal da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). São Paulo.
- Delmaschio, I. (2018) Enzimas na alimentação de animais monogástricos- revisão de literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP*, v. 2, n. 1, p. 06-20.
- Dichiara, E. L. (2019) Producción de carotenoides con capacidad antioxidante por *Bacillus licheniformis* Rt4M10. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Edison, L. K.; Shiburaj, S.; Pradeep, N. S. (2017) Microbial beta glucanase in agriculture. *Microbial advances in agriculture and human health*. Apple Academic Press, Inc.(Taylor & Francis Group, Oakville.
- FAO. 2020. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma.
- Fečkaninová, A. et al., (2017) The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*, v. 469, p. 1-8.
- Felipe, L. O.; Bicas, J. L. (2016) O Mercado de Bioaditivos para a Indústria de Alimentos. *Revista Processos Químicos*, v. 10, n. 19, p. 25-38.
- Ferreira, A. N. et al., (2020) Obtenção de celulases microbianas: uma breve revisão. *Obtenção de celulases microbianas: uma breve revisão*, p. 1-388–416.
- Food Ingredients Brasil. (2011). *Enzimas: Natureza e ação nos alimentos*. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>. Acesso em: 20 de julho de 2020.
- Forsythe, S. J. (2013) *Microbiologia da segurança dos alimentos*. Artmed Editora. 620p.
- Francis, G.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. (2001) Antinutritional factors present in

- plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, v. 199, n. 3-4, p. 197-227.
- Furuya, W. M. et al., (2008) Exigência de fósforo disponível para tilápia-do- nilo (35 a 100g). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 6, p. 961-966.
- Furuya, W. M. et al., (2018) Fitase em rações para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, n. 4, p. 489-496.
- Furuya, W. M.; Furuya, V. R. B. (2010) Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 88-94.
- Garcia, F. (2008) Suplementação alimentar com 'beta'-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede. xi, 100 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100229>>.
- Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic 469 microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, v.125, 470 p.1401-1412.
- Gomes, V. D. S. et al., (2016) Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes-revisão de literatura. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 19, n. 4.
- Gomes, V. D. S. et al., (2019) Suplementação enzimática sobre desempenho e taxa de excreção de amônia em em tilápia do nilo. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 22, n. 1.
- Gomes, V. D. S. (2018) Blend de enzimas digestivas sobre crescimento e composição corporal de juvenis de tilápia do Nilo. *Rev. Cient. Prod. Anim.*, v.20, n.2, p.59-64.
- Gore, S. R. (2006) Nutritional support of fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 15, n. 4, p. 264-268.
- Grotto, H. Z. W. (2008) Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia*, v. 30, n. 5, p. 390-397.

- Gupta, R. et al., (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616.
- Gurumallesh, P. et al. (2019) A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, v. 128, p. 254-267.
- Hong, H. A.; Duc, L. H.; Cutting, S. M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS microbiology reviews*, v. 29, n. 4, p. 813-835.
- IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2018.
- Industrial enzymes – a global market overview. Industry Experts, 2018. Disponível em: <http://industry-experts.com/verticals/biotechnology/industrial-enzymes-a-global-market-overview>. Acesso em: 02 de agosto de 2020.
- Jack, R. W.; Tagg, J. R.; Ray, B. (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, v. 59, n. 2, p. 171-200.
- Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection*, v. 2, n. 2, p. 189-198.
- Kubitza, F. (2000) Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Editora Kubitza. 316p.
- Kumar, V. et al., (2012) Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v. 96, n. 3, p. 335-364.
- Ladeira, S. A. et al., (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova (Impresso)* v. 33, p. 324-328, 2010.
- Ladeira, S. A. et al., (2015) Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp.: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic journal of biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 110-115.
- Lazado, C. C.; CAIPANG, C. M. A. (2014) Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, v. 39, n. 1, p. 78-89.
- Lazzari, R.; Baldisserotto, B. (2018) Nitrogen and phosphorus waste in fish farming. *Boletim do Instituto de Pesca, [S.l.]*, v. 34, n. 4, p. 591 – 600.

- Lee, H. J.; Kim, H. Y. (2011) Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 229- 235.
- Lin, Y. C.; Peterson, M. L. (2010) New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome. *Expert review of clinical pharmacology*, v. 3, n. 6, p. 753-767.
- Liu, S.; Moayeri, M.; Leppla, S.H. (2014) Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 22, n. 6, p. 317-32.
- Logan, N. A.; Halket, G. (2011) Developments in the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria. In: *Endospore-forming Soil Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 1-29.
- Maas, R. M.; Verdegem, M. C. J.;Stevens, T. L.; Schrama, J. W. (2020) Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutriente digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diferente quality diets, aquaculture. *Aquaculture and Fisheries group*, Wageningen University and Research, Wageningen, The Netherlands. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735723>. Acesso em 10 de julho de 2020.
- Madigan, M. T. et al., (2016) *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora.
- Mafra, D.; Cozzolino, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.
- Malajovich, M. A. *Biotecnologia*. Axcel Books do Brasil Editora, 2004.
- Mandelli, F. et al., (2010) Bactéria termófila *Thermus filiformis*: produção de carotenóides e avaliação da capacidade antioxidante.
- Marengoni, N. G. (2006) Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. *Archivos de Zootecnia*, v. 55, n. 210, p. 127-138.
- Mcvey, D. S.; Kennedy, M.; Chengappa, M. M. (2016) *Microbiologia veterinaria*. Grupo Gen-Guanabara Koogan.
- Mendonça, P. P. et al., (2012) Efeito da suplementação de fitase na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Archivos de Zootecnia*, v. 61, n. 235, p. 437-448.

- Mesquita, S. S.; Teixeira, C. M. L. L.; Servulo, E. F. C. (2017) Carotenoides: propriedades, aplicações e mercado. *Revista virtual de Química*, v. 9, n. 2, p. 672-688.
- Meurer, F.; Hayashi, C. (2003) Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de peixes-revisão. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 6, n. 2.
- Milián, G.; Pérez, M.; Bocourt, R. Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp. y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, v. 42, n. 2, p. 117-122, 2008.
- Mingmongkolchai, S.; Panbangred, W. (2018) *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology*, v. 124, n. 6, p. 1334-1346.
- Molinaro, E. M. et al., (2009) Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 4.
- Mongkolthanaruk, W. (2012) Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol*, v. 22, n. 12, p. 1597-1604.
- Monteiro, V. N.; Do Nascimento Silva, R. (2009) Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista processos químicos*, v. 3, n. 5, p. 9-23.
- Moraes, G.; De Almeida, L. C. (2020) Nutrition and functional aspects of digestion in fish. In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press. p. 251-271.
- Moreira, J. L. B.; Carvalho, C. B. M.; Frota, C. C. Visualização bacteriana e colorações. 2015.
- Motta, F. B. et al., (2008) Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres.
- Moura, G. de S. et al., (2007) Desempenho e atividade de amilase em tilápias-donilo submetidas a diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 11, p. 1609-1615.
- Nakandakare, I. B. et al., (2018) Incorporation of probiotics in the diet for juvenile

- nile tilapias: hematological, immunological and microbiological parameters. Boletim do Instituto de Pesca, [S.l.], v. 39, n. 2, p. 121-135.
- Nascimento, W. C. A. (2005) Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 79p.
- Névoa, M. L. et al., (2013) Antimicrobianos e prebióticos nas dietas de animais não ruminantes. Scientia Agraria Paranaensis, v. 12, n. 2, p. 85-95.
- Nunes, É. da S. S. et al., (2006) Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 1, p. 139-143.
- SAAD, S. M. I. (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, p. 1-16.
- Nunes, A. ; Martins, M. L. L. (2001) Isolation, Properties and Kinetics of Growth of a Thermophilic *Bacillus*. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso), Brasil, v. 32, p. 271-275.
- Ogaki, M. B.; Furlaneto, M. C.; Maia, L. F. (2015) Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. Brazilian Journal of Food Technology, v. 18, n. 4, p. 267-276.
- Oliveira, V. de M. (2015) Obtenção de proteases a partir do trato digestivo de peixes neotropicais para aplicação na produção de peptídeos de colágeno. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.
- Oliveira Sartori, A. G.; Amancio, R. D. (2012) Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. Segurança alimentar e nutricional, v. 19, n. 2, p. 83-93.
- Ordóñez, A. et al., (2014) Investigation of the antimicrobial activity of *Bacillus licheniformis* strains isolated from retail powdered infant milk formulae. Probiotics and antimicrobial proteins, v. 6, n. 1, p. 32-40.
- Paula, E.F.E., Chen, R.F.F. E Maia, F.P. (2009) Enzimas exógenas na nutrição de animais monogástricos. PUBVET, Londrina, V. 3, N. 14.
- Pedroza Filho, M. X.; Routledge, E. A. B. (2016) Intensificação produtiva da

- aquicultura brasileira e novas demandas tecnológicas. Nota técnica AGROPENSA/EMBRAPA, v. 1, p. 14.
- Peixe B.R. Anuário 2020 PeixeBr da Piscicultura. Associação Brasileira da Piscicultura. Acesso em 08 de julho de 2020.
- Pereira, L.; Mercante, C. (2018) A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. Boletim do Instituto de Pesca, v. 31, n. 1, p. 81-88.
- Polese, M. F. et al., (2010) Efeito da granulometria do milho no desempenho de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p.1469-1477.
- Pontes, T. C. (2019) Nova geração de fitase líquida em dietas para tilápias do Nilo. xvi, 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- Punekar, Narayan S. (2018) Enzymes. Springer.
- Rabinovitch, L.; De Oliveira, E. J. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. CEP, v. 21040, p. 900, 2015.
- Robinson, P. K. (2015) Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in biochemistry, v. 59, p. 1-41.
- Rocha, C. B. et al., (2010) Fitase na dieta de alevinos de carpa húngara: desempenho e características de carcaça. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 62, n. 6, p. 1462-1468.
- Rocha, C. M. C. da et al., (2013) Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. Pesquisa agropecuária brasileira, v. 48, n. 8, p. iv-vi.
- Rocha, C. B. et al., (2007) Suplementação de fitase microbiana na dieta de alevinos de jundiá: efeito sobre o desempenho produtivo e as características de carcaça. Ciência Rural, v. 37, n. 6, p. 1772-1778.
- Rotta, M. A. (2003) Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Embrapa Pantanal - Documentos (INFOTECA-E).

- Saad, S. M. I. (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 1-16.
- Sadhu, S.; Maiti, T. K. (2013) Cellulase production by bacteria: a review. *Microbiology Research Journal International*, p. 235-258.
- Sado, R. Y.; Bicudo, A. J. de A. (2012) Prevenção de doenças em peixes tem nutrição como fator determinante. *Visão Agrícola*, n. 11, p. 80-82.
- Santos, F. W. B. (2017) Nutrição de peixes de água doce: definições, perspectivas e avanços científicos. In: I Simposio de nutrição e alimentação animal, Fortaleza. [http://www.higieneanimal.ufc.br/anais/anaisb/aa24_2.pdf]. Reviewed.
- Schulz, D.; Bonelli, R. R.; Batista, C. R. V. (2009) Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus sp.p.* para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 16, n. 4, p. 403-411.
- SIDONIO, L. et al., (2012) Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES setorial*, v. 35, p. 421-463.
- Signor, A. A. et al., (2010) Desempenho de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com rações contendo complexo enzimático. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 5, p. 977-983.
- Sindirações. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Boletim Informativo do Setor. Junho, 2020. Disponível em: https://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2020/06/boletim_informativo_do_setor_junho_2020_vs_final_port_sindiracoes.pdf. Acesso em 08 de julho de 2020.
- Singh, B. et al., (2020) Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: A review. *Pedosphere*, v. 30, n. 3, p. 295-313.
- Soares, T. A.; Lins, R. D. (1995) Ribozimas: nem toda enzima é uma proteína. *química nova*, v. 18, n. 4, p. 375-378.
- Souza, F. da R. de. (2010) Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e coenzimáticos. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Stech, M. R.; Carneiro, D. J.; Júnior, J. M. P. (2009) Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. *Ensaio e Ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde*, v. 13, n. 2, p. 79-93.
- Stürmer, E. S. et al., (2012) A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. *Rev Bras Nutr Clin*, v. 27, n. 4, p. 264-72.
- Tachibana, L. et al., (2010) Xylanase and beta-glucanase on nutrient apparent digestibility of triticale by Nile tilapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 2, p. 445-452.
- Tortora, G. J.; Case, C. L.; Funke, B. R. (2012) *Microbiologia-10ª Edição*. Artmed Editora.
- Valduga, E. et al., (2009) Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2429-2436.
- Vargas-Flores, T.; Kuno-Vargas, A. *Morfología bacteriana*. 2015.
- Volkoff, H.; London, S. (2018) Nutrition and reproduction in fish. *Encyclopedia of Reproduction*, p. 743-748.
- Wiegand, Sandra et al., (2013) RNA-Seq of *Bacillus licheniformis*: active regulatory RNA features expressed within a productive fermentation. *BMC genomics*, v. 14, n. 1, p. 1-20.
- Wu, W.K; Ivanova, E. A.; Orekhov, A. N. (2020) Gut microbiome: A possible common therapeutic target for treatment of atherosclerosis and cancer. In: *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, p. 85-97.
- Yamamoto, F. Y. et al., (2011) Microminerais (Cu, Fe, Mn, Se e Zn) na nutrição de peixes, uma revisão bibliográfica. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Aquicultura.
- Zhang, Q.; Han, Y.; Xiao, H. (2017) Microbial α -amylase: A biomolecular overview. *Process Biochemistry*, v. 53, p. 88-101.
- Zhou, Y. et al., (2013) Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: the effect of exogenous cellulase. *Aquaculture*, v. 416, p. 1-7.

Zokaeifar, H. et al., (2014) Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology, v. 36, n. 1, p. 68-74.

ANEXO I – CERTIFICADO DE COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Avenida Rio Branco, 50 – Santa Lúcia – 29056-264 – Vitória – ES
27 3357-7518

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Potencial do Bacillus sp SMIA-2 e suas enzimas como aditivos de rações para peixes*", registrada sob o nº 23149.001859/2021-56, sob a responsabilidade de Priscilla Cortizo Costa Pierro, lotado(a) no Ifes campus de Alegre, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica e/ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo.

Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização: 20/07 a 14/10/2021
Espécie/linhagem/raça: Peixes (Tailandesa)
Nº de animais: 270
Peso/Idade: 3 g / 3 meses
Sexo: Fêmeas
Origem: Biotério do setor de aquicultura – Ifes Campus de Alegre

Sherrine Queiroz Fermo de Andrade
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
(portaria nº 1694, de 22 de Junho de 2016)
Instituto Federal de Educação do Espírito Santo

Vitória (ES), 20 de julho de 2021.