10.30612/agrarian.v12i46.9553

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Perfil hematológico e bioquímico e prevalência parasitária em tilápia-do-Nilo arraçoadas com probióticos dietários

Hematological and biochemical profile and parasite prevalence in Nile tilapia fed dietary probiotics

Nilton Garcia Marengoni[1], Daniele Menezes Abulquerque[2], Mateus Antonio Besen[3], Luciane Aline Weiss[4]

[1]Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Rua Pernambuco, 1777, Centro, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil, CEP 85960-000, e-mail: nmarengoni@hotmail.com
[2]Faculdade de Ciências Agrárias (FCA),Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)
[3]Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)
[4]Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Recebido em: 30/03/2019 Aceito em:05/09/2019

Resumo: Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos probióticos dietários (*Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102) sobre a resposta hematológica, perfil bioquímico de glicose e cortisol, e prevalência ectoparasitária em tilápia-do-Nilo, variedade GIFT. Utilizou-se quatro dietas (D_1 = basal sem adição de probióticos; D_2 = basal + *B. cereus*; D_3 = basal + *B. subtilis*; D_4 = basal + *B. subtilis* e *B. cereus*) e cinco repetições. Foram utilizados 1000 juvenis de tilápia (60,56 ± 7,74 g), distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de alvenaria com fundo de solo argiloso. Após 201 dias de cultivo os valores médios de hemoglobina dos peixes que receberam dietas com *B. cereus* foram superiores (P<0,05) aos arraçoados apenas com dieta basal. Não houve diferenças significativas nos valores de hematócrito, eritrócito, volume corpuscular médio, variação no tamanho das hemácias e concentração de hemoglobina corpuscular média de tilápias submetidas a dietas probióticas (P>0,05). O perfil bioquímico de glicose e cortisol, leucograma e prevalência parasitária dos peixes não foram influenciados (P>0,05) pela inclusão dos probióticos *B. cereus* e *B. subtilis* nas dietas. Independentemente das dietas contendo probióticos, há um local de preferência para os parasitas Monogenea (P<0,001) nas brânquias, enquanto a pele e nadadeiras foram os órgãos mais afetados por *Trichodina* spp. (P<0,001). A adição de probióticos *Bacillus cereus* e/ou *Bacillus subtilis* na dieta de tilápia-do-Nilo não foi capaz de beneficiar o perfil bioquímico de glicose e cortisol e perfil hematológico da série branca e vermelha dos peixes ao final do cultivo.

Palavras-chave: *Bacillus* sp., ectoparasitas, hemograma, leucograma, *Oreochromis niloticus*

Abstract: This study aimed to evaluate the effect of dietary probiotics (*Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102) on hematologic response, biochemical glucose and cortisol profile, and ectoparasitic prevalence in Nile tilapia from GIFT variety. It was utilized four diets (D_1 = basal diet (without probiotic addition); D_2 = basal diet + *B. cereus*; D_3 = basal diet + *B. subtilis*; D_4 = basal diet + *B. subtilis* e *B. cereus)* and five repetitions. A total of 1000 juveniles of tilapia (60.56 ± 7.74 g) were randomly distributed in 20 masonry tanks with clayey soil bottom. After 201 days, the average values of hemoglobin of fish fed diets with *B. cereus* were greater (P<0.05) than those fed only a basal diet. There were no significant differences in hematocrit values, erythrocyte, mean corpuscular volume, variation in size of red blood cells, and corpuscular hemoglobin concentration average of Nile tilapia fed to probiotic diets (P>0.05). The biochemical profile of glucose and cortisol, leukogram values and parasite prevalence of tilapias were not influenced (P>0.05) by the dietary addition of probiotic *B. cereus* and *B. subtilis.* It is concluded that, regardless of the probiotic containing diets, there is a preferential site for the Monogenea parasitism (P<0.001) in the gills, while the skins and fins were the organs most affected by *Trichodina* spp. (P<0.001). The addition of probiotics *Bacillus cereus* and/or *Bacillus subtilis* in the diet of Nile tilapia was not able to benefit the biochemical profile of glucose and cortisol and hematological profile of white and red series at the end of fish culture.

Keywords: *Bacillus* sp., ectoparasites, blood count, leukogram, *Oreochromis niloticus*

Introdução

Probióticos são microrganismos vivos que tem efeito benéfico sobre o hospedeiro, podendo ser capazes de modificar a microbiota intestinal e/ou ambiental, melhorar a absorção dos alimentos ou seu valor nutricional, aumentar a resposta do hospedeiro em relação à doença, ou, ainda, melhorar a qualidade do seu ambiente aquícola (Verschuere et al., 2000). Esses microrganismos benéficos ao ocuparem o trato

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

digestório dos animais, mantêm-se vivos e possuem a habilidade de melhorar a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas (Jesus et al., 2016).

Os probióticos demonstraram ser imunoestimuladores e/ou promotores de crescimento em animais aquáticos, além de possuirem mútiplos mecanismo de ação direto no hospedeiro ou indirentamento por meio da melhoria da qualidade ambiental, ou da combinação de ambos (Zorriehzahra et al., 2016; Das et al., 2017). Entretanto, a aplicabilidade e a utilização de bactérias probióticas na tilapicultura necessitam de melhor compreensão dos mecanismos que possibilitam os efeitos benéficos destes microrganismos, buscando atender as exigências de crescimento e saúde, minimizando perdas com custos endógenos e manutenção do estado de higidez dos peixes (Hai et al. 2015; Marengoni et al., 2015).

Devido aos problemas advindos da utilização de antimicrobianos sintéticos, sejam eles de ordem econômica, metodológica, sanitária e ambiental, tem-se buscado alternativas de aditivos alimentares que diminuam a utilização de quimioterápicos na aquicultura, sem causar perdas de produtividade e qualidade final do pescado, garantindo o desenvolvimento sustentável da atividade (Jesus et al., 2016; Dawood et al., 2018). Dentre as espécies de *Bacillus* probióticos mais utilizados na tilapicultura destacam-se *Bacillus subtilis* (He et al., 2013; Telli et al., 2014) e *Bacillus cereus* (Nakandakare et al., 2013; Wang et al., 2017).

A avaliação hematológica e parasitológica, associada ao monitoramento do crescimento e índice de massa corporal são importantes para caracterizar o estado fisiológico dos peixes. O perfil hematológico tem sido também aplicado como ferramenta para avaliar o bem-estar dos peixes e de perturbações no metabolismo, podendo servir como um indicador de saúde dos peixes ou em resposta ao estresse (Barcellos et al., 1999; Barros et al., 2009; Ranzani-Paiva et al., 2013; Telli et al., 2014; Tavares-Dias et al., 2015). No entanto, intervalos de referências para os peixes normais apresentam variações nos valores hematológicos, principalmente devido à extensão da variação fisiológica e as características das espécies e ambiente de cultivo (Hrubec e Smith, 2010; Tavares-Dias et al., 2015).

A prevalência de ectoparasitos é variável em função da fase de cultivo, estação temporal, sistemas de produção, bem como a relação parasita-hospedeiro (Marengoni et al., 2015; Baidoo et al., 2015). A tilápia do Nilo é frequentemente afetada por uma ampla gama de ectoparasitas, incluindo os protozoários ciliados como tricodinídeos e monogenóides (Eiras et al., 2010). Estudos referentes aos parasitas que afetam a produção em diferentes estágios de crescimento, sua prevalência e intensidade nas populações de tilápia podem ser utilizados para a implementação de gestão, técnicas e orientações sanitárias adequadas, incluindo as medidas profiláticas, tais como a utilização de aditivos probióticos na alimentação dos peixes.

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos probióticos dietários *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 sobre a prevalência parasitária de monogenóides e tricodinídeos, parâmetros hematológicos, perfil bioquímico de glicose e cortisol em tilápia-do-Nilo ao final do cultivo em tanques com fundo de solo argiloso.

Material e Métodos

O ensaio experimental foi conduzido no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), no município de Toledo, Paraná, Brasil. Foram utilizados tanques retangulares construídos em alvenaria, porém com fundo natural em solo argiloso e com aproximadamente 8,0 m^3 de volume útil de água. Os tanques apresentavam abastecimento e escoamento de água individual, monge e caixa de coleta. A reposição de água foi realizada apenas para manter a repleção dos tanques. Foram distribuídos de forma aleatória e alojados 1000 juvenis de uma população monossexo de tilápia-do-Nilo com peso de 60,56 ± 7,74 g, variedade GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) em 20 tanques. O delineamento foi constituído de quatro tratamentos (dietas) e cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais com 50 peixes.

A dieta basal foi composta de ração comercial extrusada Algomix® Agroindustrial Ltda., Toledo, Paraná, Brasil. A ração possuía granulometria de 4-6 mm, contendo 36% de proteína bruta, 6% de extrato etéreo, 3% de fibra bruta, 8% de matéria mineral, 5% de cálcio (máximo) e 2% de fósforo (mínimo). A ração comercial apresentava como ingredientes bases:

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

farelo de soja, farelo de trigo, farinha de peixes, farinha de carne, farinha de vísceras, gérmen de milho, milho integral moído, protenose, aminoácidos quelatos e, premix mineral e vitamínico, conforme informações do fabricante do produto (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal da ração comercial Algomix® conforme informações do fabricante do produto

Parâmetro nutricional	Valor
Proteína bruta (%)	36,0
Umidade (%)	13,0
Extrato etéreo (%)	6,0
Matéria Fibrosa (%)	3,0
Matéria mineral (%)	8,0
Cálcio	5,0
Fósforo	2,0

*Premix mineral e vitamínico: vitamina A = 11.000,0 UI kg^{-1}; vitamina B1 = 9 mg kg^{-1}; vitamina B12 = 25 mg kg^{-1}, vitamina B6 = 20 mg kg^{-1}, vitamina C = 400 mg. kg^{-1}, vitamina D3 = 3.000,0 UI kg^{-1}, vitamina E = 25.000 UI kg^{-1}, vitamina K3 = 1.500 mg kg^{-1}, biotina = 0,75 mg kg^{-1}, niacina = 30 mg kg^{-1}, ácido fólico = 1,5 mg kg^{-1}, ácido pantotênico = 30 mg kg^{-1},cobalto = 0,5 mg kg^{-1}, cobre = 2,5 mg kg^{-1}, ferro = 90 mg kg^{-1}, manganês = 25 mg kg^{-1}, zinco = 250 mg kg^{-1}.

Os probióticos utilizados foram *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin, Uniquímica, Diadema, São Paulo, Brasil) e *Bacillus cereus* var. *Toyoi* denominado Toyocerin (Sumitomo Chemical do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), ambos contendo 500 milhões de esporos por grama, proporcionalmente, testados individualmente e combinadas.

Os aditivos foram incorporados à ração comercial por meio do método de aspersão, utilizando uma mistura composta de 2% de óleo vegetal de soja. Na ração basal foram incluídos níveis de 0,5% de *Bacillus cereus* var. *Toyoi* (D_2), 0,5% de *Bacillus subtilis* C-3102 (D_3), 0,25% de *B. cereus* var. *Toyoi* + 0,25% *B. subtilis* C-3102 (D_4). O grupo de peixe isento da adição de probióticos (D_1) recebeu apenas a dieta basal adicionada com 2% óleo de soja na mesma proporção utilizada em todos os demais grupos experimentais.

As biometrias foram realizadas mensalmente com amostragem de 20% dos peixes de cada viveiro, onde os indivíduos eram pesados e mensurados. A taxa de arraçoamento diária foi ajustada em função da biomassa dos viveiros e da temperatura de água. Inicialmente foi utilizado 5% da biomassa oferecida aos peixes quatro vezes ao dia, chegando ao final de 201 dias de cultivo com uma taxa de 2% distribuída duas vezes ao dia.

O monitoramento da qualidade de água incluiu a temperaturada água, mensurada diariamente, o oxigênio dissolvido, medido semanalmente, utilizando o oxímetro Hanna modelo HI 9828; o potencial hidrogênio (pH) pelo medidor de pH portátil Hanna HI 8424, condutividade com o equipamento Hanna HI 9835 e a transparência da água com um disco de Secchi todos medidos semanalmente.

Todos os peixes foram pesados e medidos no início e final do cultivo. Determinou-se o fator de condição de Fulton (Kf) que é considerado como o quociente entre o peso observado e o peso teoricamente estimado por meio da relação peso/comprimento.

Ao final de 201 dias de cultivos das tilápias, realizou-se coletas de cinco peixes por tanque e transferiu-se para laboratório para realização de exames clínicos macroscopicamente de verificação de eritemas, descamações, hematomas ou outras anormalidades aparentes nas nadadeiras, narina, boca, olhos, face interna dos opérculos e brânquias. Posteriormente adotou-se a eutanásia por secção medular.

As análises parasitológicas foram realizadas a fresco sendo utilizado uma raspagem dos tegumentos dos lados direito e esquerdo, na pele e nadadeiras de 100 peixes e a retirada do 1º e 2º arco branquial de cada lado dos peixes avaliados. Após estes procedimentos decorreu-se a observação em microscopia de luz com lentes de 40 e 100x, utilizando lâminas umidificadas em solução salina saturada e lamínula para facilitar a visualização (Eiras et al., 2010).

A prevalência ectoparasitária foi calculada segundo Eiras et al. (2010) baseada na equação: P (%) = 100 x Ni/He onde, P é a prevalência, Ni é o número de hospedeiros infectados e He é o número de hospedeiros examinados.

A componente sistemática utilizada para análise ectoparasitária em função da alimentação de juvenis de tilápia-do-Nilo com dieta contendo diferentes probióticos e os órgãos analisados foi $Yijk = \mu + \alpha i + \beta j + \alpha\beta ij + \varepsilon ijk$, em que: Yijk = Tipo de probiótico i, Tipo de órgão analisado j e

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

repetição k (i= 1, 2, 3, 4; j= 1, 2, 3; k=1, 2, 3, 4, 5); μ: Média populacional; αi: Efeito do tipo de probiótico i; βj: Ocorrência de prevalência parasitária dos órgãos j; εij: Erro residual.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos e do perfil bioquímico de glicose e cortisol, cinco indivíduos de cada unidade experimental foram coletados aleatoriamente, após o jejum de 12 horas e insensibilizados antes da coleta de sangue usando eugenol e água a 75 mgL^{-1}. As amostras de aproximadamente 2 mL de sangue foram recolhidas por venopunção do vaso caudal com seringas esterilizadas (2 mL) e agulhas contendo EDTA a 10%. Do volume total de sangue retirado, uma alíquota de 1 mL foi acondicionada e homogeneizada em tubos previamente identificados, contendo EDTA (0,1 mL) como anticoagulante para a preservação das amostras destinadas aos ensaios hematológicos. O outro 1 mL de sangue coletado foi transferido para tubo estéril sem EDTA e centrifugado a 3500 rpm por cinco minutos para a obtenção de soro para a dosagem de cortisol pelo método da quimiluminescência em laboratório. A determinação da glicose do sangue dos peixes foi realizada imediatamente após a coleta utilizando o medidor de glicose portátil (Accu-CheckSoftclix, Advantage; Roche Diagnosis®).

O número de eritrócitos foi determinado por meio da contagem em câmara de Newbauer sob microscópio óptico com objetiva de 40x utilizando-se o diluente de Hayem. O hematócrito foi realizado pelo método do microhematócrito e a concentração de hemoglobina pelo método de cianometahemoglobina. Foram confeccionadas extensões sanguíneas coradas com May Grünwald-Giemsa, e utilizadas para contagem diferencial e total de leucócitos pelo método indireto (Hrubec e Smith, 2010; Ranzani-Paiva et al., 2013). A partir dos valores obtidos da contagem de eritrócitos, hematócrito, e taxa de hemoglobina determinaram-se os índices hematimétricos absolutos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

A componente sistemática para os parâmetros hematológicos foram Yik = μ + αi + εik, em que: Yik = Efeito do probiótico i e repetição k (i= 1, 2, 3, 4; k=1, 2, 3, 4, 5); μ: Média populacional; αi: Efeito do probiótico i; εik: Erro residual.

A pressuposição de normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, cuja hipótese de nulidade expressa que os dados apresentam distribuição normal. Os valores médios das variáveis analisados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) *oneway*, com auxílio do software computacional estatístico Sisvar e, em caso de evidência de significância as médias foram comparadas pelo de Tukey a 5% de probabilidade.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os principais propostos pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas de Universidade Estadual do Oeste do Paraná (protocolo nº 81/2009 CEEAAP/Unioeste).

Resultados e Discussão

Os valores médios dos parâmetros da qualidade de água, oxigênio dissolvido (4,70 ± 0,80 mg L^{-1}), pH (7,4 ± 0,20), condutividade (46,66 ± 3,21 μS cm^{-1}) e transparência (40,99 ± 3,51 cm) foram considerados adequados para aquicultura e ao cultivo da espécie. A temperatura média da água, mensurada diariamente, variou entre 20,70 ºC e 26,60 ºC, ficando abaixo dos níveis ideias de conforto, preconizados para um bom desempenho de tilápia-do-Nilo que é de 26 ºC a 32 ºC (El-Sayed, 2006). Os parâmetros de qualidade de água condutividade, transparência, oxigênio dissolvido, pH e temperatura não foram influenciados (P>0,05) pela utilização dos probióticos adicionados à ração comercial para tilápia-do-Nilo cultivadas em tanques.

A avaliação de glicose e cortisol tem sido utilizada como chave de indicador da ocorrência de estresse em diversos organismos. Quanto aos valores de glicose e cortisol não foram verificadas alterações significativas com a adição dos probióticos nas dietas utilizadas para tilápias (Tabela 2).

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão para as variáveis de comprimento (CP), peso (PE), sobrevivência (SB), Fator de Condição (Kf), glicose e cortisol para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo probióticos

Variável	Dieta				Valor P
	D_1	D_2	D_3	D_4	
CP (cm)	28,46±3,37	27,37 ± 2,70	29,80±3,03	27,74±2,55	0,412
PE (g)	421,42±103,17	414,92±110,47	490,67±104,49	447,72±115,98	0,171
Kf	1,83±0,29	2,04±0,26	1,84±0,25	2,09±0,18	0,310
SB (%)	84,50±3,00	85,60±0,89	86,00±0,11	85,60±0,89	0,510
Glicose	60,40±21,21	70,40±22,01	74,00±25,49	70,40±21,95	0,803
Cortisol	17,44±7,54	12,46±7,88	16,88±6,43	15,19±3,33	0,633

D_1= Ração basal sem adição de probióticos; D_2= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus cereus*; D_3= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus subtilis*; D_4= Ração adicionada de 0,25 % de *B. subtilis* e 0,25 % de *B. cereus*.

Os resultados dos valores de glicose descritos neste trabalho estão próximos aos obtidos por Hrubec et al. (2000), que apresentaram valores máximos de 69 g dL^{-1} em tilápias híbridas alimentadas com dieta comercial. Nesse contexto, Neu et al. (2013) verificaram glicose média de 54 a 69 mg dL^{-1} de sangue de tilápia-do-Nilo arraçoadas com dietas contendo diferentes teores de glicerol e Tavares-Dias et al. (2015) relataram resultados de 14,1 a 92,1 g dL^{-1} de sangue de tilápia-do-Nilo de cultivo intensivo. O perfil de glicose e cortisol dos peixes do presente trabalho são inferiores aos encontrados por Biswas et al. (2004), relatando que a tilápia-do-Nilo, quando em situação de estresse, apresentaram valores de glicose e cortisol de 160,20 mg dL^{-1} e 191,70 mg dL^{-1} respectivamente. Portanto, os resultados de glicose plasmática deste trabalho indicam que os peixes não estavam em condição estressoras, mantendo os níveis normais para a espécie (Hrubec et al., 2000; Hrubec e Smith, 2010).

Os parâmetros zootécnicos, comprimento, peso, fator de condição Kf e sobrevivência não foram influenciados pela inclusão dos probióticos *B. cereus* var *Toyoi* e *B. subtilis* C-3102. Marengoni et al. (2015), a exemplo do presente estudo, porém avaliando o cultivo em tanques-rede também verificaram valores para o fator Kf maiores que o esperado (Kf>1) para a espécie estudada, porém relatando que não houve efeito negativo (P>0,05) no bem-estar dos peixes devido à adição de probióticos nas dietas avaliadas (Tabela 2). A ausência de efeitos nos parâmetros zootécnicos, comprimento, peso, sobrevivência e o fator de condição Kf das tilápias pode ser atribuída à falta de desafios durante o ensaio experimental, ainda que a prevalência parasitária encontra-se elevada.

Os valores médios de hemoglobina dos peixes que receberam dietas com *Bacillus cereus* (D_2) foram superiores (P<0,05) aos observados nos peixes que receberam a dieta basal isenta de probiótico (D_1), porém não houve diferenças significativas nos valores de hemoglobinas entre os peixes arraçoados com dietas adicionadas de probióticos (Tabela 3).

Quanto à taxa de hemoglobina, os resultados descritos neste estudo estão próximos aos obtidos por Hrubec et al. (2000), que apresentaram médias de 7,0 a 9,8 g dL^{-1} ao avaliarem intervalos de referência para tilápias híbridas, Telli et al. (2014) que descreveram valores de 7,45 a 8,14 g dL^{-1} nas análises de sangue de tilápia-do-Nilo submetidas a adição de *Bacillus subtilis* na dieta e cultivados em diferentes densidades de estocagem e por Tavares-Dias et al. (2015) que apresentaram resultados de 7,9 a 14,5 g dL^{-1} de sangue de tilápia-do-Nilo de cultivo intensivo.

A adição de probióticos nas dietas das tilápias não afetou a eritropoiese dos peixes e os valores observados mantiveram-se dentro do intervalo de referência estabelecido para a espécie (Hrubec e Smith, 2010). Não foi observada diferença (P>0,05) nos valores de eritrócitos, variação no tamanho das hemácias (RDW), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) em tilápia-do-Nilo, submetidas a diferentes dietas contendo probióticos. Pode-se afirmar que os peixes mantiveram o estado de higidez, uma vez

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

que os parâmetros hematológicos praticamente não revelaram alterações significativas ao final período experimental. Estes resultados corroboram com Nakandakare et al. (2013), que também não verificaram alterações dos parâmetros hematológicos de hemoglobina, VCM e HCM para juvenis de tilápia-do-Nilo ao avaliarem as formas de inclusão do probiótico PAS TR®, no processamento de rações.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de hematócrito (%), hemoglobina (gdL^{-1}), eritrócitos (10^6 mm^{-3}), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), variação no tamanho das hemácias (RDW) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápia-do-Nilo submetidas a diferentes dietas contendo probióticos

Variável	Dieta				Valor P
	D_1	D_2	D_3	D_4	
Hematócrito	26,75±10,18	27,37±2,70	29,80±3,03	27,74±2,55	0,070
Hemoglobina	8,46±0,89b	10,34±1,14ª	9,6±0,97ab	9,14±0,89ab	0,042
Eritrócitos	2,3±0,11	2,2±0,12	2,3±0,12	2,2±0,23	0,643
VCM (fL)	178,3±16,41	179,66±7,84	175,02±6,45	182,52±8,10	0,719
HCM (pg)	45,65±2,48	45,24±4,00	42,95±1,15	45,46±1,44	0,309
CHCM (g dL^{-1})	24,95±1,31	25,18±1,71	25,06±1,76	24,94±0,55	0,999
RDW (%)	8,9±0,61	10,28±0,86	9,76±0,98	9,34±1,20	0,161

D_1= Ração basal sem adição de probióticos; D_2= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus cereus*; D_3= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus subtilis*; D_4= Ração adicionada de 0,25 % de *B. subtilis* e 0,25 % de *B. cereus*.Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Os resultados da contagem total de eritrócitos encontrados neste estudo (Tabela 3), são próximos aos obtidos por Jerônimo et al. (2011), que verificaram 1,30 a 2,27 x 10^3 μL^{-1} eritrócitos no sangue, ao avaliarem a influência sazonal sobre os parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo. Os parâmetros hematológicos de série vermelha, com exceção do volume corpuscular médio (VCM), foram considerados normais para a espécie, como descritos por Hrubec e Smith (2010) e Barros et al. (2009), sendo que as variáveis eritrocitárias, bem como os valores apresentados no leucograma se apresentaram dentro dos padrões estipulados como referência para *Oreochromis niloticus* de cultivo intensivo proposto por Tavares-Dias et al. (2015).

A adição de *Bacillus* sp. nas dietas de tilápia-do-Nilo não interferiram negativamente na síntese de leucócitos (Figura 1). Os linfócitos foram responsáveispela maior parte dos leucócitos com valores médios de 85%, valores próximos aos observados (84% de linfócitos) por Neu et al. (2013) medidos em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de arginina. Porém, os valores médios de leucócitos (%) neste estudo estão acima dos valores de referência (16 a 69%) para *O. niloticus* (Tavares-Dias et al., 2015). Pode-se inferir que os peixes permaneceram sadios e que a adição de probióticos na dieta, não causou alterações no diferencial de leucócitos, ainda, o elevado percentual de linfócitos, refletiu um estado de higidez entre os animais. De forma similar ao presente estudo Costa et al. (2014) ao avaliarem a influência de diferentes fontes de óleo da dieta sobre os parâmetros hematológicos de *O. niloticus* não verificaram diferença ($p>0,05$) para os percentuais médios e diferenciação de leucócitos.

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

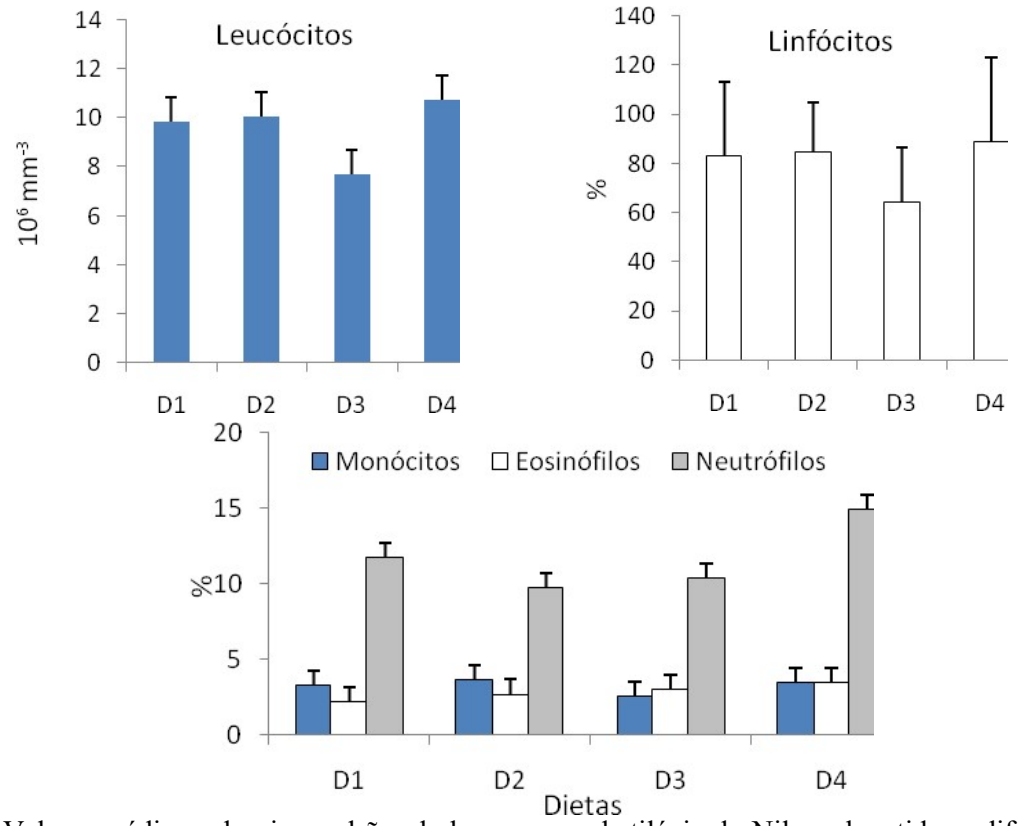


Figura1. Valores médios e desvios padrões do leucograma de tilápia-do-Nilo, submetidas a diferentes dietas contendo probióticos. D_1= Ração basal sem adição de probióticos; D_2= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus cereus*; D_3= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus subtilis*; D_4= Ração adicionada de 0,25 % de *B. subtilis* e 0,25 % de *B. cereus.* Não houve diferenças entre as dietas para as variáveis (P>0,05).

No leucograma não houve alterações significativas na contagem de leucócitos (Figura 1) e não foi observado leucopenia, linfocitopenia e neutrofilia nos peixes arraçoados com ou sem a adição de probióticos. O perfil de leucócitos sanguíneos pode indicar ativação do sistema imunológico, auxiliando na identificação de doenças, estresse e outras situações adversas nos peixes que levam aos estados de desequilíbrio homeostático. Além disso, os valores de leucócitos podem apresentar variações interespecíficas influenciadas por características próprias dos peixes e interespecífica como sazonalidade, reprodução, nutrição, necessidades metabólicas das espécies e presença de patógenos (Ranzani-Paiva et al., 2013; Tavares-Dias et al., 2015). A hipótese que os peixes parasitados podem desencadear um processo de anemia, caracterizado por redução da concentração de hemoglobina, redução do hematócrito e número de eritrócitos não pode ser sustentada, pois foram observados elevados valores da prevalência parasitária tanto nos peixes arraçoados com adição de probióticos, quanto no lote que recebeu ração isenta de aditivo probiótico.

A resposta ao estresse em peixes é caracterizada pela estimulação de alterações metabólicas e fisiológicas. Essas alterações aumentam a tolerância de um organismo para enfrentar uma variação ambiental ou uma situação adversa, mantendo um estado de homeostase (Nakandakare et al., 2013). Sob condições de estresse o corpo do peixe emite respostas imediatas reconhecidas como primárias e respostas secundárias. A resposta primária a liberação de hormônios do estresse, cortisol e catecolaminas para corrente sanguínea pelo sistema endócrino. As respostas secundárias ocorrem como consequência dos hormônios do estresse liberados, causando alterações químicas no sangue e tecidos, por exemplo, um aumento de glicose no plasma (Begg e Pankhurst, 2004). A elevação plasmática de cortisol e glicose é reconhecida como indicadores das principais respostas ao estresse em teleósteos. Geralmente, o estresse crônico resulta em uma elevação dos

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

níveis de cortisol e glicose em *O. niloticus* (Barcellos et al., 1999). Nesse contexto, o estresse pode afetar a atividade dos leucócitos, levando a imunossupressão, o que facilitaria a infestação por parasitas e agentes infecciosos.

A dieta probiótica utilizada não foi capaz de influenciar positivamente como medida profilática para minimizar a prevalência parasitária em tilápia-do-Nilo, bem como não foi verificado efeito de interação entre os fatores dieta x órgãos dos peixes analisados (Tabela 4). Marengoni et al. (2015) encontraram resultados semelhantes ao presente trabalho ao avaliarem a presença de parasitas em tilápia-do-Nilo cultivadas sob diferentes dietas probióticas em tanques-rede, relatando também a maior prevalência de Monogenia em relação à *Trichodina* spp. nos filamentos branquiais. Jerônimo et al. (2011) reportaram o gênero *Trichodina* como dominante na pele das tilápias, associandoos valores de prevalência à sazonalidade.

Com relação aos sítios de infestação (órgãos) avaliados, verificou-se que a pele apresentou maior prevalência parasitária (P<0,001) por *Trichodina* spp., seguida de nadadeiras e brânquias. As brânquias albergaram maior infestação (P<0,001) de Monogenea, seguida por pele e nadadeira das tilápias. Os tricodinídeos foram encontrados em menor incidência nas brânquias, enquanto os monogenoides destacam-se com menor frequência nas nadadeiras (Tabela 4). É perceptível a preferência na relação parasita/órgão, pelos tricodinídeos que se comportam como ectoparasitas da pele de peixes (Marengoni et al., 2015; Baidoo et al., 2015).

Tabela 4. Prevalência média (%) de Monogenea e *Trichodina* spp., na pele, brânquias e nadadeiras de tilápia-do-Nilo, submetidas a diferentes dietas contendo probióticos

		Trichodina spp.	Monogenea
Órgão	Pele	90,00A	30,00B
	Brânquias	7,50C	99,00A
	Nadadeiras	54,50B	7,00C
		Fcal=102,775; P=0,001	Fcal=193,468; P=0,001
Dieta	D_1	56,00	44,00
	D_2	50,67	46,67
	D_3	49,33	46,67
	D_4	46,67	44,67
Dieta	Órgão	Fcal=0,693; P=0,561	Fcal=0,121; P=0,948
D_1	Pele	92,00	36,00
	Brânquias	16,00	96,00
	Nadadeiras	60,00	0,00
D_2	Pele	92,00	32,00
	Brânquias	0,00	100,00
	Nadadeiras	60,00	8,00
D_3	Pele	96,00	28,00
	Brânquias	4,00	100,00
	Nadadeiras	48,00	12,00
D_4	Pele	80,00	24,00
	Brânquias	10,00	100,00
	Nadadeiras	50,00	10,00
		Fcal=0,688; P=0,660	Fcal=0,560; P=0,760

D_1= Ração basal sem adição de probióticos; D_2= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus cereus*; D_3= Ração adicionada de 0,5 % de *Bacillus subtilis*; D_4= Ração adicionada de 0,25 % de *B. subtilis* e 0,25 % de *B. cereus*.

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Nos resultados obtidos infere-se que o possível estresse pelas elevadas incidências parasitárias não afetou a eritropoiese, sugerindo que os peixes foram capazes de manter o padrão hematológico ao final do cultivo, garantindo o

desempenho zootécnico em resposta à adição de *Bacillus* sp. nas dietas, possivelmente devido ao equilíbrio entre parasitas e hospedeiros. A elevada prevalência de parasitas nos peixes pode ser associada com a fonte de água utilizada nos tanques, derivada de rio e que pode transportar, possivelmente, fontes desses agentes patogênicos. Além disso, não foram associados processos anemiantes que levasse as alterações na produção, ou a perda de eritrócitos, em decorrência de hemólise, hemorragia, ou por espoliação parasitária (Eiras et al., 2010).

As tilápias apresentam inúmeros atributos que as tornam favorável ao cultivo comercial. Porém, as situações de cultivo intensivo e crescimento acelerado podem influenciar o status imunológico e aumentar a susceptibilidade às doenças. Associado ao manejo inadequado e estresse dos peixes, as enfermidades são as maiores causas de perdas na piscicultura mundial, sendo maior importância nas regiões neotropicais, devido às características climáticas, fator que permite uma disseminação muito rápida de doenças (Eiras et al., 2010; Costa et al., 2014). Nesse contexto, as estratégias de utilização de probióticos e seus benefícios têm se demonstrado como uma promissora ferramenta profilática para a gestão da saúde dos animais, da qualidade ambiental e da sustentabilidade da cadeia produtiva da tilapicultura.

A utilização de probióticos na piscicultura vêm sendo estudada com o foco nas várias estratégias para modular a composição da microbiota intestinal de peixes, a fim de se obter melhores taxas de crescimento, digestão, imunidade, resistência a doenças e sobre tudo para garantir a sustentabilidade da atividade (Dawood et al., 2018). Contudo, os resultados obtidos com a utilização de probióticos são bastante controversos, sendo necessário o isolamento e desenvolvimento de probióticos autóctones (Jesus et al., 2016).

Conclusões

A adição de probióticos *Bacillus cereus* e/ou *Bacillus subtilis* na dieta de tilápia-do-Nilo não foi capaz de beneficiar significativamente o perfil bioquímico de glicose e cortisol e perfil hematológico da série branca ou leucocitária e vermelha (hematócrito, contagem de células vermelhas, volume corpuscular médioe concentração de hemoglobina corpuscular média) dos peixes no final do cultivo em tanques.

A inclusão de probióticos dietários *Bacillus cereus* e/ou *Bacillus subtilis* não influencia positivamente como medida profilática para minimizar a prevalência média de *Trichodina* spp. e Monogenea na pele, brânquias e nadadeiras de tilápia-do-Nilo. Independentemente da adição de probióticos nas dietas dos peixes, os protozoários tricodinídeos se apresentam com maior frequência de infestação na pele e nadadeiras de tilápia-do-Nilo, enquanto que as brânquias albergam maior infestação de Monogenea no final do cultivo dos peixes em tanques.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudos ao terceiro e quarto autor.

Referências

BAIDOO, K.; ABOBIBAIDOO, S. M.; AGBEKO, E. Ecto-parasites infestation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in concrete ponds in Tamale, Ghana. **International Journal of Aquaculture**, v. 5, n. 3, p. 1-5, 2015.

BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research,** v. 30, n. 6, p. 437-444, 1999.

BARROS, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 8, p. 895-903, 2009.

BEGG, K.; PANKHURST, N. W. Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical dam selfish *Acanthochromis polyacanthus*. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 1, p. 133-145, 2004.

BISWAS, A. K.; MAITA, M.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. **Journal of Fish Biology**, v. 65, n. 3, p. 811-821, 2004.

COSTA, D. V.; FERREIRA, M. W.; NAVARRO, R. D.; ROSA, P. V.; MURGAS, L. D. S. Parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de óleo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, p. 754-764, 2014.

DAS, S.; MONDAL, K.; HAQUE, S. A review on application of probiotic, prebiotic and symbiotic for sustainable development of aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 2, p. 422-429, 2017.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ABEL-DAIM, M. M.; VAN DOAN, H. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-18, 2018. DOI: https://doi.org/10.1111/raq.12272

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. **Diversidade dos parasitos de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Clichetec, 2010, 333p.

EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia culture**. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing, 2006, 277p.

HAI, N. V. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 592-597, 2015.

HE, S.; ZHANG, Y.; XU, L., YANG, Y.; MARUBASHI, T.; ZHOU, Z.; YAO, B. Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂. **Aquaculture**, v.412, p.125-130, 2013.

HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* hybrid). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 29, p. 7-12, 2000.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fishes. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010, p. 994-1003.

JESUS, G. F. A.; MOURIÑO, J. L. M.; VIEIRA, F. N.; SILVA, B. C.; MARTINS, M. L.; JATOBA, A. Probiótico na piscicultura. In: PEREIRA, G. K.; PIRES, H. S.; FEREIRA, L. S. B. P.; KANGERSKI, K.W. Piscicultura continental com enfoque agroecológico. 1. ed. Gaspar: Publicação do IFSC, 2016. p. 64-94.

MARENGONI, N. G.; WEISS, L. A.; ALBUQUERQUE, D. M.; MOURA, M. C. Influência de probióticos na prevalência parasitária e níveis de glicose e cortisol em tilápia do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 245, p. 63-69, 2015.

NAKANDAKARE, I. B.; IWASHITA, M. K. P.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E. Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics. **Acta Scientiarum Animal Science,** v. 35, p. 365-370, 2013.

NEU, D. H.; FURUYA, W. M.; BOSCOLO, W. R.; POTRICH, F. R.; LUI, T. A.; FEIDEN, A. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 211-217, 2013.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1. ed. Maringá: Eduem. 140 p. 2013.

TAVARES-DIAS, M.; DIAS-JÚNIOR, M. B. F.; FLORENTINO, A. C.; SILVA, L. M. A.; CUNHA, A. C. Distribution pattern of crustacean ectoparasites of freshwater fish from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 136-147, 2015.

TELLI, G. S.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DIAS, D. D.; SUSSEL, F. R.; ISHIKAWA, C. M.; TACHIBANA, L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, p. 305-311, 2014.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, 655-671, 2000.

WANG, M.; LIU, G.; LU, M.; KE, X.; LIU, Z.; GAO, F.; CAO, J.; ZHU, H.; YI, M.; YU, D. Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3163-3173, 2017.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; DELSHAD, S. T.; ADEL, M; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K; LAZA, C. C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016.