

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ADITIVO SIMBIÓTICO FLORAFIX[®] E SUA INFLUÊNCIA
NO DESEMPENHO E NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS
DE TILÁPIA DO NILO, CRIADAS EM TANQUES-REDE

Autora: Alciony Andréia da Cunha Alexandre
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Novembro - 2018

ADITIVO SIMBIÓTICO FLORAFIX[®] E SUA INFLUÊNCIA
NO DESEMPENHO E NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS
DE TILÁPIA DO NILO, CRIADAS EM TANQUES-REDE

Autora: Alciony Andréia da Cunha Alexandre
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada como parte das exigências
para a obtenção do título de DOUTORA
EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-
graduação em Zootecnia da Universidade
Estadual de Maringá- Área de concentração
Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Novembro - 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Alexandre, Alciony Andréia da Cunha

A381a Aditivo simbiótico florafix® e sua influência no desempenho e nos parâmetros fisiológicos de tilápia do Nilo, criadas em tanques-rede/ Alciony Andréia da Cunha Alexandre. -- Maringá, 2018.
48 f. : il. color., figs. , tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2018.

1. Tilapicultura - Desempenho. 2. Glicose. 3. *Oreochomis niloticus*. 4. Glicose. 5. Parâmetros sanguíneos. 6. Simbiótico. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 22. ED.639.3774
Jane Lessa Monção CRB 1173/9



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ADITIVO SIMBIÓTICO FLORAFIX® E SUA INFLUÊNCIA
NO DESEMPENHO E NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS
DE TILÁPIA DO NILO, CRIADAS EM TANQUES-REDE

Autora: Alciony Andréia da Cunha Alexandre
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 30 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes
de Oliveira

Prof. Dr. Silvio Claudio da Costa

Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Orientador

Dedico este trabalho a Deus, pelo presente maravilhoso que é a vida! Agradeço também pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho, em especial minha filha Fernanda, meu esposo Luiz e aos meus pais Moacyr e Palmira Cunha. Cada uma delas, ao seu modo me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proteger e guiar em meu caminho.

Agradeço ao meu orientador professor Ricardo Pereira Ribeiro, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, confiança e dedicação e ensinamentos.

Ao professor Carlos A. L. Oliveira e ao colega Jailton da Silva Bezerra Júnior, pelo auxílio com a análise estatística.

Aos colegas do grupo PeixeGen, que contribuíram durante o experimento.

Aos funcionários do CRN, Mário Everaldo da Silva, Antônio Aparecido de Oliveira, Sergio Aparecido de Almeida e em especial ao zootecnista Luiz Alexandre Filho, por fornecer toda estrutura, apoio e companheirismo durante todo o experimento.

Ao funcionário da CODAPAR, Vitor Moises, por toda ajuda.

A amiga Melina Franco Coradini, por toda ajuda e companheirismo durante os créditos, coletas e análises.

Gostaria de agradecer também minha família, por estar sempre presente, em especial minha filha Fernanda, meu esposo Luiz Alexandre Filho e aos meus pais Moacyr U. da Cunha e Palmira Sestito da Cunha.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio.

A Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação Zootecnia (PPZ) e ao Campus Regional do Noroeste (CRN), pela estrutura oferecida.

BIOGRAFIA

ALCIONY ANDRÉIA DA CUNHA ALEXANDRE, filha de Moacyr Ubirajara da Cunha (*in memoriam*) e Palmira Sestito da Cunha, nascida em 02 de dezembro de 1969 em Terra Rica – PR.

Em março de 1987, iniciou no curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Estado de São Paulo, concluindo em 1992.

Em setembro de 2001, iniciou no curso de Pós-graduação em Sanidade Animal, na Universidade Federal do Paraná, em nível de mestrado, concluindo em setembro de 2003.

Em março de 2015, iniciou no curso de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de doutorado, na Universidade Estadual de Maringá. Submeteu-se ao exame geral de qualificação em junho de 2018 e defesa da tese em novembro de 2018.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Qualidade do Filé de Tilápia do Nilo.....	2
1.2. Espécie Estudada – Tilápia do Nilo.....	4
1.3. Produção de Peixes em Tanques-rede.....	5
1.4. Uso de Simbióticos na Ração de Peixes.....	6
1.5. Hematologia em Peixes.....	8
1.6. Histologia Hepática.....	10
1.7. Histologia Intestinal.....	11
1.8. Expressão Gênica.....	12
1.9. Referências.....	13
II. OBJETIVOS GERAIS.....	24
III. FLORAFIX® symbiotic additive and its influence on the performance and physiological parameters of Nile tilapia, raised in net-tanks.....	25
Abstract.....	25
Resumo.....	25
Introduction.....	26
Material and Methods.....	27
Results and Discussion.....	33
Conclusion.....	37

Acknowledgments.....	37
References.....	37

LISTA DE TABELAS

	Página
III. FLORAFIX[®] symbiotic additive and its influence on the performance and physiological parameters of Nile tilapia, raised in net-tanks	
Table 1. Qualitative and quantitative composition of the symbiotic micro-encapsulated symbiotic FLORAFIX [®] : prebiotic + probiotic.....	44
Table 2. Diet Formulation.....	45
Table 3. Characteristics of primers used in this study.....	45
Table 4. Mean values and standard deviation observed for total villus height and width (μm) of mucosa from mid-intestine portion of juvenile Nile tilapia after 210 days of feeding.....	46
Table 5. Mean values and standard deviation of hematological and biochemical parameters of tilapia fed with increasing levels of dietary additive.....	47
Table 6. Mean values and standard deviation of the chemical composition of tilapia fillets fed with increasing levels of dietary additive.....	47
Table 7. Mean values and standard deviation of slaughter weight, fillet weight and fillet yield of tilapia fed with increasing levels of dietary additive.....	47

Table 8. Mean values and standard deviation for colorimetry (CIELab), Tbars, pH and CRA and fillet gene expression of tilapia fed with increasing levels of dietary additive.....	48
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
III. FLORAFIX[®] symbiotic additive and its influence on the performance and physiological parameters of Nile tilapia, raised in net-tanks	
Figure 1. Liver of Nile tilapia Juvenile. Detail of the liver without histopathological changes. Hematoxylin, objective 20x.....	46
Figure 2. Intestinal wall showing the villi epithelial layer from intestines middle portion of Nile tilapia Juvenile. Hematoxylin, objective 20x.....	46

RESUMO

Os antibióticos adicionados na alimentação animal são utilizados para tratar infecções ou como forma profilática em animais saudáveis. O seu uso frequente, pode promover possível surgimento de bactérias resistentes, causando ameaças à saúde dos animais e a humana. Desta forma, ingredientes alternativos e de alta qualidade alimentar podem ser utilizados em substituição ao uso excessivo de antibióticos, sendo sugerido na presente pesquisa a avaliação do simbiótico FLORAFIX[®] no desempenho zootécnico e nos parâmetros fisiológicos de tilápias do Nilo cultivadas em tanques-rede. O total de 3.300 juvenis da variedade TILAMAX invertidos sexualmente e com peso médio de $60,18 \pm 8,44$ g foram dispostos em 30 tanques-rede, de acordo com a densidade média de 110 peixes/m³. Cinco tratamentos foram testados, sendo eles: T1 (controle), T2: 6,25 g, T3: 12,50 g, T4: 18,75 g e T5: 25,00 g de FLORAFIX[®] adicionados a cada 25 kg de ração com 32% PB e diâmetro de 4 a 8 mm. Análises de contrastes foram realizadas entre todos os tratamentos e em seguida, a análise de regressão foi realizada considerando o nível de ($p < 0,05$) como significativo. Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos valores considerados ideais para as condições de bem-estar para a espécie estudada (temperatura da água de 24,03°C; pH de 5,5 e oxigênio dissolvido igual a 6,1 mg.L⁻¹). Para os parâmetros de desempenho zootécnicos analisados durante o experimento (peso a despesca, peso do filé e rendimento do filé), histologia intestinal (altura total dos vilos e largura), níveis de cortisol, qualidade de filé e expressão de genes do sistema antioxidante nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos. No entanto, os valores médios de glicose ($101,30 \pm 30,45$ mg.dL⁻¹) foram significativamente maiores para os animais que

receberam a dieta contendo a maior dosagem do simbiótico, em relação àqueles que receberam a ração isenta ($69,14 \pm 17,08 \text{mg.dL}^{-1}$) ou com dietas contendo menores dosagens do aditivo ($62,85 \pm 15,29$; $65,97 \pm 13,11$ e $72,59 \pm 15,59 \text{mg.dL}^{-1}$). Desta forma, pode-se concluir que a utilização do simbiótico na concentração de 25,00g/25 kg de ração, apresentou alterações significativas na concentração da glicose e nenhuma das dosagens utilizadas interferiu no desempenho zootécnico, na saúde e bem-estar dos peixes utilizados neste trabalho.

Palavras-chave: glicose, *Oreochromis niloticus*, parâmetros sanguíneos, simbiótico, tilapicultura.

ABSTRACT

Antibiotics added in animal feed are used to treat infections or as prophylactic form in healthy animals. Its frequent use, can promote a possible emergence of resistant bacteria, causing threats to the human and animals health. In this way, alternative and high-quality food ingredients can be used to substitute the antibiotics overuse, so it is suggested in this research the symbiotic FLORAFIX[®] evaluation in animal performance and physiological parameters of Nile Tilapias grown in net-tanks. A total of 3,300 TILAMAX variety, sexually inverted and with average weight of 60.18 ± 8.44 g, were arranged in 30 net-tanks, according to the average density of 110 fish.m^{-3} . Five treatments were evaluated: T1 (control), T2: 6.25 g, T3:12.50 g, T4:18.75 g and T5: 25.00 g of FLORAFIX[®] added to each 25 kg of feed with 32% CP and diameter from 4 to 8 mm. Contrast analyses were carried out among all treatments and then the regression analysis was performed considering the level of ($p < 0.05$) as significant. The water quality parameters remained within the values considered ideal as welfare conditions for the studied species (water temperature of 24.03°C ; pH of 5.5 and dissolved oxygen equal to 6.1 mg.L^{-1}). For animal performance parameters analyzed during the experiment (harvest weight, fillet weight and fillet yield), intestinal histology (villus total height and width), cortisol levels, fillet quality and antioxidant system gene expression, no statistical difference was observed among treatments. However, the average glucose values ($101.30 \pm 30.45 \text{ mg.dL}^{-1}$) were significantly higher for animals receiving diet with the highest symbiotic dosage, in relation to those who received the control ration ($69.14 \pm 17.08 \text{ mg.dL}^{-1}$) or diets containing lower additive dosages (62.85 ± 15.29 ; 65.97 ± 13.11 and $72.59 \pm 15.59 \text{ mg.dL}^{-1}$). Then, it can be concluded that the

symbiotic use in the concentration of 25.00g per 25 kg of ration, showed significant changes in the glucose concentration and none of the used dosages interfered in animal performance, health and well-being of the fish used in this work.

Keywords: glucose, *Oreochromis niloticus*, blood parameters, symbiotic, tilapia culture.

I. INTRODUÇÃO

A produção aquícola é o setor que mais cresce diante de outros grandes setores de produção de alimentos. Segundo relatório, em 2016 a produção global aquícola (incluindo plantas aquáticas) foi de 110,2 milhões de toneladas e um faturamento de 243,5 bilhões de dólares. Mais uma vez, o grupo mais produzido foi o de peixes com 54,1 milhões de toneladas (FAO, 2018).

O continente asiático detém 89,39% de toda a produção aquícola mundial, sendo que a China produziu 60% deste total (FAO, 2016). O Brasil nesta última década ocupou o 14º lugar dentre os países com maior produção aquícola, em 2017 totalizou 691,7 mil toneladas proporcionando o crescimento de 8% quando comparado à produção de 2016 que foi de 640,51 mil toneladas. Deste total o estado do Paraná participou com 112 mil toneladas sendo considerado o Estado com maior produção (Peixe BR, 2018).

O consumo crescente de pescado no mundo está sendo impulsionado pelo aumento populacional, do poder aquisitivo das populações de países em desenvolvimento como China, Índia e Brasil e pela procura por alimentos mais saudáveis (FAO, 2018).

O consumo mundial per capita de pescado foi de 20,1 kg no ano de 2015 (FAO, 2016), estimativas preliminares sobre os anos de 2016 e 2017 apontam para um novo aumento de 20,3 kg e 20,5 kg, respectivamente (FAO, 2018). E segundo o Ministério da Agricultura, no Brasil o consumo foi de 14,4 kg por habitante/ano, superando os 12 kg por habitante/ano recomendado pela Organização Mundial da Saúde (MPA, 2014).

Este crescimento é devido, em parte, ao maior interesse por dietas mais saudáveis e que são capazes de reduzir o risco de doenças coronárias e obesidade (Oetterer & Lima, 2010). Ademais, o pescado é uma boa fonte de proteínas, lipídios, minerais e componentes bioativos, podendo variar o percentual dos nutrientes dependendo da espécie, época do ano, idade, sexo e estado nutricional dos animais (Gonçalves, 2011).

Diante deste cenário, torna-se essencial o incremento de pesquisas para o desenvolvimento de sistemas de manejo adequados para a espécie, que atualmente é cultivada para suprir sua alta demanda para o mercado consumidor. A inclusão de simbiótico na dieta de tilápias tem como finalidade melhorar a imunidade dos animais no ambiente de cultivo.

O simbiótico utilizado foi o FLORAFIX[®] que é um produto à base de probiótico, prebiótico com efeitos benéficos ao organismo contribuindo, em especial, com a melhoria da flora intestinal, o que é um fator imprescindível no equilíbrio e manutenção da saúde e bem-estar dos animais. Neste contexto, o presente artigo teve por objetivo revisar os efeitos do consumo de simbióticos, e quantidades indicadas destes na alimentação de tilápias criadas em tanques-rede.

1.1. Qualidade do Filé de Tilápia do Nilo

O pescado é um alimento de alto valor nutritivo, constituindo uma das mais importantes fontes proteicas de alto valor biológico com balanço amino-acídico, além de sua composição rica em lipídios insaturados, vitaminas e sais minerais. Este apresenta ótimas características sensoriais e de aceitabilidade pelos consumidores (Macedo-Viegas & Souza, 2004; Rapoport et al., 2011).

O pescado é um dos alimentos mais perecíveis e, por isso, necessita de cuidados na manipulação desde o momento em que é capturado, passando por todas as fases do processamento, até chegar ao consumidor final. A manipulação neste intervalo determina a intensidade e velocidade com que apresentam as alterações enzimáticas, oxidativas e bacterianas. É dependente do método utilizado na captura, da espécie dos peixes e de como foram aplicados os princípios básicos de manipulação e conservação (Pereda et al., 2005).

Em se tratando da tilápia, o filé possui valores de rendimento variando de 30 a 40%, em média 75% de água, entre 3,4 a 8,5 de lipídios, 20% de proteínas e 2% de minerais (Kubiza, 2000). O filé é livre de espinhas, de cor branca, textura firme, aspecto fibroso e suculento, além do mais a carne é saborosa e de boa qualidade nutricional, com baixo teor de gordura e de calorias (Silva et al., 2009), tornando-o de grande aceitação e apreciação pelos consumidores.

O rendimento de filé pode depender de diversos fatores como o peso corporal, sexo, composição corporal (gordura visceral), características anatômicas (relação cabeça/corpo), grau de mecanização na filetagem, método de filetagem e destreza do operador (Clements & Lovell, 1994; Macedo-Viégas & Souza, 2004).

O conhecimento da composição química dos pescados é de fundamental importância para a padronização dos produtos alimentares na base de critérios nutricionais. Estudos realizados recentemente têm demonstrado que a modulação de dietas permite aprimorar o perfil, a composição e a qualidade de filés de tilápias do Nilo, transformando-os em um produto final, com propriedades melhoradas (Carbonera et al., 2014; Tocher, 2015; Montanher et al., 2016; Sarker et al., 2016). Desta forma, o enriquecimento das rações destinadas aos organismos aquáticos representa a possibilidade de agregar valor através da produção de filés de qualidade superior para o consumo humano (Leanhardt, 2011).

Pesquisas no desenvolvimento de alimentos funcionais e ingredientes que causem melhoria na eficiência alimentar e no desempenho dos peixes intensificaram-se nos últimos anos (Sanders, 1998). Dentre os alimentos, estão os probióticos, prebióticos e simbióticos, que são definidos como suplementos alimentares constituídos a partir de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999; Verschuere et al., 2000; Irianto & Austin, 2002). O estado nutricional é considerado um fator importante que determina a capacidade do peixe em resistir as doenças, o uso destes nutracêuticos é um meio eficaz de aumentar a imunocompetência e a resistência a doenças de peixes (Irianto & Austin, 2002).

1.2. Espécie Estudada – Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linnaeus, (1758) é uma espécie originária do continente Africano e da Palestina, e está amplamente distribuída por todo mundo, em vários países de clima tropical e subtropical, é uma espécie de peixe da família dos ciclídeos e possui hábito alimentar fitoplanctófago (Boscolo et al., 2002).

A tilápia possui hábito alimentar onívoro de amplo espectro, podendo aproveitar uma vasta variedade de alimentos, incluindo plâncton, macrófitas aquáticas, invertebrados bentônicos, larvas de peixes e detritos (Popma & Masser, 1999). Reproduzem-se com facilidade e podem chegar ao tamanho comercial dentro de uma mesma estação de crescimento (Wang & Lu, 2015).

É um peixe que possui características de grande interesse zootécnico, mesmo em sistemas intensivos, rusticidade, grande adaptabilidade, carne magra, com 2,1% de gordura. Essa espécie apresenta características de filé desejáveis pelo mercado consumidor, tais como: carne branca, textura firme, sabor delicado, ausência de espinhas em Y, além das características produtivas desejáveis para a criação como a alta taxa de crescimento e adaptabilidade em diversas condições de criação, fazendo da tilápia uma das principais espécies mais cultivadas mundialmente (González Jr. & Brown, 2006; Stevanato et al., 2008; Omena et al., 2010).

A tilapicultura no Brasil em suas mais diversas modalidades de sistema de cultivo fomentou a produção aquícola de 357.239 Ton. em 2017 (Peixe BR, 2018).

De acordo com Ribeiro (2001) apesar de ser uma espécie difundida há vários séculos, somente entre a década de 1920 e 1950, passou a ser cultivada de forma intensiva. A primeira variedade de tilápia do Nilo que chegou ao território brasileiro em 1971, na cidade de Pentecostes no Estado do Ceará, conhecida como Bouaké, vinda da Costa do Marfim, era composta por 60 exemplares importados por técnicos do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas), com intuito de melhorar a produção por área (Castagnolli, 1992; Beyruth et al., 2004). A variedade conhecida como Chitralada, chegou ao Brasil no ano de 1996, e 20.800 animais foram adquiridos por produtores do Paraná (Zimmermann, 1999).

Nos anos de 2002 e 2005, foram introduzidas duas variedades resultantes de programas de melhoramento, a tilápia Geno Mar Supreme (GST), produzida por uma

empresa Norueguesa – GENOMAR e introduzida no Brasil pela piscicultura Aquabel na cidade de Rolândia - PR e a tilápia GIFT (Genetically Improved Farmed Tilápia) - originária da Malásia, desenvolvida inicialmente pelo ICLARM (International Center for Living Aquatic Resources Management), atual World Fish Center. A variedade GIFT foi desenvolvida a partir de vinte anos de seleção, e foram envolvidas quatro linhagens silvestres de tilápias capturadas entre os anos de 1988-1989 no Egito, Gana, Quênia e Senegal, e quatro linhagens confinadas, introduzidas nas Filipinas de 1979 a 1984, de Israel, Singapura, Tailândia e Taiwan (Bentsen et al., 1998) e introduzida no Brasil por meio da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá – Paraná, Brasil.

1.3. Produção de Peixes em Tanques-rede

Tanques-rede são definidos como estrutura flutuante, destinadas a criação de peixes, que podem ser montadas em vários formatos e tamanhos, sendo delimitada por telas ou redes, que permite a livre circulação de água (Costa, 2003).

O sistema de produção de peixes em tanques-rede é uma técnica considerada como intensiva, sendo uma alternativa de investimento de menor custo e maior rapidez de implantação. Utiliza elevada densidade de estocagem e, por isso, exige constante renovação de água para a dispersão dos resíduos metabólicos dos peixes no ambiente (Guarino et al., 2005; Guo et al., 2009).

Os tanques-rede podem ser implantados no mar, em estuários, lagos, lagoas e rios, bem como em represas formadas por nascentes, canais de irrigação e grandes reservatórios de hidroelétricas (Conte, 2002; Rotta & Queiroz, 2003). Devem ser instalados em lugares previamente selecionados, e usar como critério, a boa qualidade da água, a proteção de ventos e ondas e a natureza moderada das correntes e profundidade (Beveridge, 2004; Alexandre Filho, 2008).

Fatores como a obstrução da passagem da água nas laterais e no fundo dos tanques-rede pelo acúmulo de materiais orgânicos e do crescimento de algas, podem dificultar a renovação da água. O formato dos tanques-rede também pode influenciar a passagem da água, os cúbicos e os retangulares permitem a maior e mais rápida renovação, quando comparado com os cilíndricos (Ono & Kubiza, 2003).

É oportuno lembrar que a criação de tilápias em tanques-rede apesar de ser bastante difundida em todo o mundo, somente a partir do ano 2000, surgiu com volume de produção no Brasil (Scorvo Filho et al., 2010). O cultivo de peixes em tanques-rede é um sistema que proporciona uma excelente produtividade por área, pois permite a produção em menor espaço disponível (Maciel et al., 2013).

1.4. Uso de Simbióticos na Ração de Peixes

No Brasil, a aquicultura, vem enfrentando dificuldades na produção e comercialização do pescado por problemas relacionados às enfermidades, principalmente causadas por bactérias (Sebastião et al., 2011). Na tentativa de minimizar as perdas, grande quantidade de antibióticos vem sendo utilizado com o propósito profilático e até mesmo como promotores de crescimento, e pode resultar no aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos (Kiron, 2012). Para reverter essa situação, o uso de simbióticos pode ser uma alternativa para melhorar a saúde do trato gastrointestinal dos peixes, e conseqüentemente, a resposta imune desses animais (Codorva et al., 2009).

O interesse em se utilizar ecossistema microbiano intestinal tem crescido, sendo empregado como ferramenta para melhoria da saúde animal e humana. As vantagens do uso da microbiota intestinal natural contra agentes patogênicos incluem a facilidade de aplicação e baixos custos econômicos e laborais (Callaway et al., 2008).

“Simbióticos” são definidos como uma mistura de probióticos + prebióticos que agem beneficiando o hospedeiro ao melhorar a sobrevivência dos suplementos dietéticos microbianos no trato gastrointestinal (TGI). Estes compostos atuam estimulando seletivamente o crescimento e/ou metabolismo de certo grupo de microrganismos (Collins & Gibson, 1999). Essa combinação pode melhorar a viabilidade dos microrganismos probióticos, uma vez que eles utilizam os prebióticos como substrato para a fermentação, contribuindo para a estabilização e/ou aperfeiçoamento dos efeitos probióticos (Awad et al., 2008; Falaki et al., 2010).

Os probióticos, prebióticos e simbióticos são definidos como aditivos alimentares, compostos por uma ou mais culturas de microrganismos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller, 1989; Sanders, 1998;

Gatesoupe, 1999; Irianto & Austin, 2002). Adicionados à dieta, são capazes de modificar ou manipular as comunidades microbianas, aumentar o crescimento e a sobrevivência de espécies criadas (Horowitz & Horowitz, 2000).

“Prebióticos” são ingredientes não digestíveis da dieta, que afetam benéficamente o hospedeiro ao selecionar e estimular o crescimento de bactérias benéficas no trato intestinal, já os “Probióticos” são definidos como microrganismos vivos que colonizam o trato digestivo e melhoram a saúde do hospedeiro. O termo probiótico significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico que significa contra a vida (De Vrese & Shrezenmea, 2008).

Simbióticos são classificados como alimentos funcionais e nutracêuticos, que fazem a reposição e estímulo da flora natural benéfica do trato gastrointestinal; produção de bacteriocinas (antibiótico natural) e outros compostos que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis ao hospedeiro. A utilização de simbióticos é uma alternativa viável e segura na aquicultura, na prevenção de doenças (Mattar et al., 2001) e podem substituir os antibióticos no controle de doenças (Nikoskelainen et al., 2001; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Nayak, 2010). Segundo Gram & Ringo (2005), cultura de microrganismos vivos administrados ao alimento ao meio ambiente (Água), para aumentar a sobrevivência do hospedeiro.

As características desejáveis de um simbiótico para aquicultura são: inibir a proliferação de patógenos, por exclusão competitiva ou produção de compostos inibitórios; melhorar a taxa de crescimento do animal; melhorar a conversão alimentar; melhorar a sobrevivência frente à infecção por patógenos e imunoestimulante, aumentando a produção de células de defesa (Chiu et al., 2007).

Poucos estudos avaliaram a suplementação com simbiótico para peixes, e a suplementação conjunta de mananoligossacarídeo e *Bacillus sp.* na aquicultura resultou em melhoria do crescimento e utilização do alimento (Daniels et al., 2010; Azevedo et al., 2016). Já a adição de probiótico, prebiótico e simbiótico na nutrição de alevinos de tilápia do Nilo podem melhorar o consumo de ração e conversão alimentar sem diferir no ganho de peso, tamanho do intestino e a taxa de sobrevivência (Schwarz et al., 2016).

O simbiótico FLORAFIX[®] é um produto à base de probiótico, prebiótico e tem como mecanismo de ação, competir com patógenos por sítio de fixação e nutrientes em

um processo conhecido como exclusão competitiva, eliminar patógenos por meio de síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio e estimular componentes específicos e não específicos do sistema imunológico (Nakadakare et al., 2013).

1.5. Hematologia em Peixes

A hematologia estuda a morfologia, bioquímica e função das células sanguíneas e dos órgãos que as produzem, bem como, o efeito de doenças nos parâmetros sanguíneos (JU-52). A maioria dessas informações consiste em medidas de valores dos parâmetros hematológicos em condições normais e anormais (Ranzini-Paiva et al., 2013).

A hematologia vem se tornando importante instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas dos peixes (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004), e consentem em avaliar as condições de defesa orgânica e identificar as respostas dos peixes perante dos desafios de criação de forma eficiente (Ranzani-Paiva et al., 2013).

É possível avaliar o estado nutricional dos peixes por meio de análise das características hematológicas, pois o sangue é um dos tecidos mais dinâmicos do organismo e se altera em função do tipo de dieta consumida (Ranzini-Paiva & Silva-Souza, 2004).

O sangue é um tecido líquido, móvel, do tipo conjuntivo, contido no aparelho circulatório, que o mantém em movimento regular e unidirecional, devido fundamentalmente as contrações rítmicas do coração (Junqueira & Carneiro, 2011). O sangue constitui uma das grandes forças homeostáticas do organismo (Kalashnikova, 1976). É constituído por células em suspensão em um fluido intercelular denominado, plasma (fase líquida), formado por 90% de água, 7% de proteínas (globulinas e albumina) e 3% de solutos, como eletrólitos. A fase sólida é composta por glóbulos vermelhos (eritrócitos) e glóbulos brancos (leucócitos e trombócitos) (Feldman et al., 2000), dentre as avaliações que podem ser desempenhadas a partir das coletas sanguíneas, os parâmetros relacionados a série vermelha, auxiliam na identificação de processos anêmicos e os glóbulos brancos no diagnóstico de processos infecciosos.

O sangue distribui calor, transporta gases, nutriente, além de atuar na defesa do organismo. O volume de sangue nos peixes teleósteos é em torno de 1,5 a 3,0% do peso

vivo (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004). A quantidade e a proporção das diferentes células presentes no sangue periférico (vascular) refletem no estado fisiológico do organismo, no momento ou por um período da vida, apresentando ampla variação em função de fatores externos e internos (Junqueira & Carneiro, 2011; Ranzani-Paiva et al., 2013).

Quando o peixe, sob o efeito de agente estressor, desencadeia respostas denominadas respostas ao estresse que podem ser divididas em primárias que são aquelas medidas pelos hormônios catecolaminas e cortisol (Barton, 2002), as respostas secundárias, que compreendem os efeitos bioquímicos e fisiológicos associados ao estresse, como a hiperglicemia, aumento das proteínas totais e modificação hematológica (Affonso et al., 2002; Andrade et al., 2007) e as respostas terciárias que atingem o organismo como um todo, comprometendo o crescimento, a reprodução e o sistema imunológico do organismo (Affonso et al., 2009).

Os peixes desenvolvem inúmeras estratégias adaptativas para assegurar sua sobrevivência no meio aquático, quando ocorrem extremas variações no meio ambiente (Ranzani-Paiva et al., 2013). Nesse sentido, ressalta-se que os parâmetros hematológicos e bioquímicos, são importantes para identificar as alterações fisiológicas, derivadas da nutrição e de fatores ambientais, como a temperatura, que possam interferir na hematopoiese dos peixes submetidos a determinados sistemas de criação e/ou alimentação. Prontamente, é possível verificar sua resposta homeostática e de estresse decorrentes de fatores ambientais e/ou nutricionais, por meio das alterações.

Nos últimos anos, pesquisadores de diversos países têm dado grande importância aos estudos dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e metabólicos de peixes. As análises hematológicas e bioquímicas do sangue fornecem subsídios importantes para o diagnóstico e prognóstico das condições de saúde dos peixes, principalmente quando em confinamento e submetido a diferentes taxas de arraçoamento e ao estresse (Melo et al., 2006).

As alterações fisiológicas dos peixes são refletidas na composição sanguínea, modificando os parâmetros bioquímicos e hematológicos (Hrubec et al., 2001). Os peixes têm também a faculdade de utilizar órgãos diferentes para formar células sanguíneas, quando o órgão principal está acometido (Ranzani-Paiva et al., 2013). Deste modo, a análise sanguínea pode mostrar disfunções agudas e crônicas, relacionadas à

nutrição, qualidade da água, presença de toxinas e doenças, perante diferentes situações (Hrubec et al., 2001).

1.6. Histologia Hepática

O fígado de tilápias é constituído pelo estroma e pelo parênquima, e é o maior órgão extramural, sendo composto por dois lóbulos que estão relacionados com o intestino. A vesícula biliar é bem desenvolvida e tem uma forma arredondada. O estroma recobre o órgão, protegendo-o e dele partem tabiques de tecido conjuntivo que fornecem sustentação ao órgão (Vicentini et al., 2005; Torres et al., 2010).

O fígado é responsável pelo metabolismo de substâncias tóxicas, que pode sofrer alterações estruturais e metabólicas, mediante a exposição de poluentes, alterações na alimentação, toxinas, parasitos e microrganismos (Arellano et al., 1999; Reece, 2006).

O tecido hepático tem inúmeras funções importantes nos peixes, participando da síntese de proteínas plasmáticas, como a albumina e fibrinogênio, lipídios, carboidratos e vitelogenina (Jobling, 1995; Bruslé & Anadon, 1996). Entre as funções do fígado, está a sua capacidade de acumular substâncias de reserva, especialmente sob a forma de glicogênio e lipídios (Ferguson, 2006; Genten et al., 2009).

A histologia do fígado varia entre espécies de peixes de água doce, mas existem características gerais que são encontradas na maioria das espécies, como por exemplo, os hepatócitos que possuem menor tendência a se dispor em cordões ou em lóbulos, quando comparados com os mamíferos. A estrutura hepática normalmente pode variar de acordo com o sexo, idade, alimentação, temperatura, e sistema endócrino devido ao meio ambiente, regulados pelas condições de criação (Genten et al., 2009).

A nutrição inadequada e a qualidade do alimento podem influenciar na estrutura do fígado, podem provocar alterações histológicas, sendo comumente reconhecidos como vacuolização dos hepatócitos, degeneração gordurosa do fígado, alterações na atividade metabólica, alterações no parênquima hepático e necrose, essas variáveis podem ser interpretadas como respostas ao estresse ambiental, sendo considerados indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (Teh et al., 1997; Rašković et al., 2011).

1.7. Histologia Intestinal

A tilápia do Nilo possui hábito alimentar fitoplanctófago, com tendência onívora, ingerem todo o tipo de material orgânico disponível na água (Moreira et al., 2001). O tubo digestivo é relativamente simples, iniciando na válvula pilórica e terminando no reto, não sendo separado em delgado e grosso, como nos mamíferos (Silveira et al., 2009). O intestino pode ser dividido em três partes: (1) intestino cefálico, (2) intestino anterior e (3) intestino posterior que corresponde ao intestino verdadeiro, em que ocorrem os processos químicos da digestão e absorção de alimentos (Moreira et al., 2001).

O intestino possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos de sangue e de linfa, em que se completa a digestão iniciada no estômago. Sendo o local em que ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução, que facilita a absorção. Nos peixes, além da função de digestão e absorção, o intestino pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação e na respiração (Silveira et al., 2009).

O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar e as características dos alimentos naturalmente ingeridos pelos peixes. O trato digestório consiste em um tubo composto por lúmen e uma parede formada basicamente por quatro camadas distintas: (a) muscular da mucosa é composta por um revestimento epitelial e lamina própria (tecido conjuntivo frouxo, vascularizado, contendo nervos e leucócitos), (b) submucosa, consiste em uma camada adicional de tecido conjuntivo, (c) túnica muscular é formada por camadas longitudinais e circulares de músculo estriado, (d) serosa é uma camada de tecido frouxo, rica em vasos sanguíneos e revestida por células mesoteliais (Genten et al., 2009; Wilson & Castro, 2011).

O intestino possui uma barreira de antígenos e uma camada de muco que recobre a superfície, que tem funções mecânicas protetoras contra bactérias provenientes dos alimentos e dos microrganismos oportunistas do meio ambiente (Anbuezhian et al., 2011). O muco também favorece o estabelecimento e manutenção de uma microbiota que antagoniza bactérias potencialmente patogênicas (Faure et al., 2006).

O intestino dos peixes apresenta grande diversidade estrutural, variando até mesmo em espécies com hábitos alimentares semelhantes (Reifel & Travill, 1979; Buddington & Diamond, 1997).

1.8. Expressão Gênica

De acordo com Johnston (1999) e Aguiar et al. (2005) o tecido muscular estriado esquelético dos peixes corresponde de 40 a 75% da sua massa corporal e suas fibras musculares se distribuem em três compartimentos: vermelho, intermediário e branco; predominando o compartimento branco que corresponde a aproximadamente 70% do volume total do tecido muscular (Sänger & Stoiber, 2001).

A classificação das fibras musculares em peixes leva em consideração duas características funcionais: velocidade de contração (lenta ou rápida) e atividade metabólica (aeróbica/oxidativa ou anaeróbica/glicolítica). O diâmetro das fibras musculares pode variar, dependendo da arquitetura do músculo de cada animal (Sänger & Stoiber, 2001).

As fibras musculares brancas apresentam maiores diâmetros (entre 50 e 100 μm) e menor suprimento de capilares sanguíneos e possuem velocidade de contração rápida e metabolismo glicolítico (Sänger & Stoiber, 2001).

O compartimento vermelho corresponde entre 10% e 30% de toda a musculatura miotomal, é constituído por fibras musculares vermelhas. O compartimento intermediário possui fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias em relação as das fibras musculares brancas e vermelhas caracterizadas pela contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston, 1981).

O crescimento muscular nos peixes ocorre mediante a proliferação e a diferenciação dos mioblastos (Alfei et al., 1994; Johnston et al., 2000). E a taxa de crescimento muscular pode ser afetada por diversos fatores ambientais, incluindo os nutricionais (Johnston, 2006). A expressão gênica foi uma forma de mensurar o nível de expressão de algumas enzimas envolvidas nesse sistema.

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada como importante abordagem experimental para conhecer não somente a função gênica, mas também para compreender como os mecanismos moleculares estão relacionados com

processos biológicos (Vedoy et al., 1999). Dessa forma, uma das questões mais relevantes é entender como os elementos na sequência de DNA são utilizados, sob que condições cada produto gênico é sintetizado e, uma vez sintetizado, qual a sua função no organismo (Liu & Cordes, 2004).

Assim, pesquisas com tilápia do Nilo sobre a expressão dos genes catalase (CAT), glutationaperoxidase (GPX) e glutationasintetase (GSS), são importantes pelas alterações provocadas pelo estresse no desempenho dos animais. Além disso, mudanças no padrão alimentar podem causar modificações na expressão de genes do sistema antioxidante e também afetar o desempenho. A relação dos genes do sistema antioxidante com a capacidade de retenção de água do filé e diversas funções metabólicas faz dos genes catalase (CAT), glutationaperoxidase (GPX) e glutationasintetase (GSS) seja um alvo potencial para estudos da variação genética e sua associação com características dos parâmetros zootécnicos dos peixes (Gross & Nilsson, 1999; Olsvik et al., 2005).

1.9. Referências

AFFONSO, E.G.; BARROS, F.P.; BRASIL, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A. Indicadores fisiológicos de estresse em peixes expostos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Macapá: Embrapa, 2009. p.346-360.

AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CORRÊA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G.; RANTIN, F.T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.133, p.375-382, 2002.

AGUIAR, D.H.; BARROS, M.M.; PADOVANI, C.R.; PEZZATO, L.E.; DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Jornal of Fish Biology**, v.675, p.1287-1298, 2005.

ALEXANDRE FILHO, L. **Desempenho produtivo e econômico da Tilápia do nilo (*O. Niloticus*) cultivada em tanques-rede nos períodos de inverno e verão, no rio do Corvo-Paraná**. 2008. 45p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

ALFEI, L.; ONALI, A.; SPANO, L.; COLUMBARI, P.T.; ALTAVISTA, P.L.; DE VITA, R. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio L.*). **European Journal of Histochemistry**, v.38, p.151-162, 1994.

ANBUCHEZHIAN, R.; GOBINATH, C.; RAVICHANDRAN, S. Antimicrobial peptide from the epidermal mucus of some estuarine cat fishes. **World Applied Sciences Journal**, v.12, p.256-260, 2011.

ANDRADE, J.I.A.; ONO, E.A.; MENEZES, G.C.; BRASIL, E.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L.; AFFONSO, E.G. Influence of diet supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.576-580, 2007.

ARELLANO, M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.62-72, 1999.

AWAD, W.; GHAREEB, K.; BÖHM, J. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. **International Journal of Molecular Science**, v.9, p.2205-2216, 2008.

AZEVEDO, V.R.; FILHO, F.C.J.; PEREIRA, L.S.; CARDOSO, D.L.; JÚNIOR, V.V.M; ANDRADE, R.D. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.9-16, 2016.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.517-525, 2002.

BENTSEN, H.B.; EKNATH, A.E.; VERA, M.S.P.; DANTING, J.C.; BOLIVAR, H.; REYES, R.A.; DIONISIO, E.E.; LONGALONG, F.M.; CIRCA, A.V.; TAYAMEN, M.M.; GJERD, B. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, n.160, p.145-173, 1998.

BEVERIDGE, M.C.M. **Cage aquaculture**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 368p.

- BEYRUTH, Z.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; FUSCO, S.M.; FARIA, F.C.; SILVA, A.L. Utilização de alimentos naturais por *Oreochromis niloticus* em tanques de terra com arraçoamento. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.9-24, 2004.
- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.539-545, 2002.
- BRUSLÈ, J.; ANADON, G.G. The Structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Ed.). **Fish morphology horizon of new research**. Lebanon: Science Publishers, 1996. p.77-93.
- BUDDINGTON, R.K.; DIAMOND, J.M. Pyloric caeca of fish: a “new” absorptive organ. **American Journal of Physiology**, v.252, p.65-76, 1997.
- CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; HARVEY, R.B.; GENOVESE, K.J.; KENNEDY, C.N.; VENN, D.W.; NISBET, D.J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v.9, p.217-225, 2008.
- CARBONERA, F.; BONAFE, E.G.; MARTIN, C.A.; MONTANHER, P.F.; RIBEIRO, R.P.; FIGUEIREDO, L.C.; ALMEIDA, V.C.; VISENTAINER, J.V. Effect of dietary replacement of sunflower oil with perilla oil on the absolute fatty acid composition in Nile tilapia (GIFT). **Food Chemistry**, v.148, p.230–234, 2014.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP. 1992.189p.
- CHIU, C.H.; GUU, Y.K.; LIU, C.H.; PAN, T.M.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.364-77, 2007.
- CLEMENT, S.; LOVELL, R.T. Comparison of processing yield and nutrient composition of culture Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.119, p.299-310, 1994.
- COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.1052-1057, 1999.
- CONTE, L. **Produtividade e economicidade da tilapicultura em gaiolas na região Sudeste do Estado de São Paulo: estudos de casos**. 2002. 59p. Dissertação (Mestrado)

- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CORDOVA, A.C.I; GONZALEZ, A.L; SUASTEGUI, J.M; GUZMÁN, G.A; ASCENCIO, F.; OCAMPO, H.A.G. Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *crassostrea corteziensis* (Bivalvia: ostreidae). **Revista de Biologia Tropical**, v.59, p.183-191, 2009.

COSTA, F.J.C.B. **Cartilha cultivo de peixes em tanques-rede**. Maceió: Sebrae, 2003. 33p.

DANIELS, C.L.; MERRIFIELD, D.L.; BOOTHROYD, D.C.; DAVIES, S.J.; FACTOR, J.R.; ARNOLD, K.E. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. **Aquaculture**, v.304, p.49-57, 2010.

DE VRESE M.; SCHREZENMEIR J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Food Biotechnology**, v.111, p.1-66, 2008.

FALAKI, M.; SHARGH, M. S.; DASTAR, B.; ZREHDARAN, S. Effects of different levels of probiotic and prebiotic on performance and carcass characteristics of broiler chickens. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, p.2390-2395, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)**. Roma. 2018.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)**. Roma. 2016.

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D.; GODIN, J.P.; VUICHOUD, J.; ROCHAT, F.; BREUILLÉ, D.; OBLED, C.; CORTHÉSY-THEULAZ, I. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sodium-treated rats. **Journal of Nutrition**, v.136, p.1558-1564, 2006.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, C.N. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.1344p.

FERGUSON, H.W. (Ed.). **Systemic pathology of fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease**. 2.ed. London: Scotian Press, 2006. 367p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147-165, 1999.
- GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. Respiratory system. In: GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Enfield, NH: Science Publishers, 2009. p.104-110.
- GONÇALVES, A.A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011. 608p.
- GONZÁLES JR, J.M.; BROWN, P.B. Nile tilapia *Oreochromis niloticus* as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. **Advances in Space Research**, v.38, p.1132-1137, 2006.
- GRAM, L.; RINGO, E. Prospects of Fish Probiotics. In: HOLZAPFEL, W.; NAUGHTON, P. **Microbial Ecology in Growing Animals**. Edinburgh: Elsevier, 2005. p.379-417.
- GROSS, R.; NILSSON, J. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. **Aquaculture**, v.173, p.73-80, 1999.
- GUARINO, A.W.S.; BRANCO, C.W.C.; DINIZ, G.P.; ROCHA, R. Limnological characteristics of an old tropical reservoir (Ribeirão da Lages Reservoir, RJ, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.17, p.129-141, 2005.
- GUO, L.; LI, Z.; XIE, P; NI, L. Assessment effects of cage culture on nitrogen and phosphorus dynamics in relation to fallowing in a shallow lake in China. **Aquaculture International**, v.17, p.229-241, 2009.
- HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. Efficacy of probiotics in growout systems. **The advocate**, v.3, p.12, 2000.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A.; ROBERTSON, J.L. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops x Morone saxatilis*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.30, p.8-15. 2001.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.333-342, 2002.
- JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. 1.ed. London: Chapman & Hall, 1995. 309p.
- Johnston, I. A. Muscle development and growth : potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v.177, p.99-115, 1999.

- JOHNSTON, I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.2249-2264, 2006.
- JOHNSTON, I.A. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. **Cell and Tissue Research**, v.214, p.369-379, 1981.
- JOHNSTON, I.A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; DINGWALL, A.; MITCHELL, D.; SELKIRK, C.; NICKELL, D.; BAKER, R.; ROBERTSON, B.; WHYTE, D.; SPRINGATE, J. Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo solar L.*). **Aquaculture**. v.189, p.335-349, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- KALASHNIKOVA, Z.M. On the classification of morfological elements in the blood of fish. **Journal Ichthyology**, v.3, p.459-472, 1976.
- KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v.274, p.1-14, 2008.
- KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v.173, p.111-133, 2012.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2000. 289p.
- LEONHARDT, C. Ingredientes e aditivos para o pescado. In: Gonçalves, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011. p.303-317.
- LINNAEUS, C. **Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis**. Laurentius Salvius: Holmiae, 1758. 824p.
- LIU, Z.J.; CORDES, F.J. DNA marker technology and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v.238, p.1-37, 2004.
- MACEDO-VIÉGAS, E.M.; SOUZA, M.L.R. Pré-processamento e conservação do pescado produzido em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.) **Tópicos Especiais em**

Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. São Paulo: TecArt, 2004. p.405-480.

MACIEL, E.C.S.; FEITOSA, K.C.O.; CORRÊA NETO, C.R.; MACEDO, F.F.; MATTIOLI, W.O.; ABIMORAD, E.G.; ABREU, J.S. Desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos de juvenis de pacu criados em tanques-rede em diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, p.185-194, 2013.

MATTAR, A.F.; DRONGOWSKI, R.A.; CORAN, A.G.; HARMON, C.M. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery International**, v.17, p.265-268, 2001.

MELO, J.F.B.; LUNDSTEDT, L.M.; METÓN, I.; BAANANTE, I.V.; MORAES, G. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.145, p.181-187, 2006.

MONTANHER, P.F.; COSTA E SILVA, B.; BONAFÉ, E.G.; CARBONERA, F.; SANTOS, H.M.C.; FIGUEIREDO, I.L.; MARUYAMA, S.A.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V. Effects of diet supplementation with chia (*Salvia hispanica L.*) oil and natural antioxidant extract on the omega-3 content and antioxidant capacity of Nile tilapia fillets. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.118, p.698–707, 2016.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO R.P. Fundamentos da moderna aquicultura – Canoas: ULBRA, 2001. 200p.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2014.

NAKANDAKARE, I.B.; IWASHITA, M.K.P.; DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.39, p.121–135, 2013.

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

NIKOSKELAINEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G.; OUWEHAND, A.C. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention

of infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2430-2435, 2001.

OETTERER, M.; LIMA, U.A. Pescado. In: LIMA, U.A. **Matérias primas dos alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2010. p.359-389.

OLSVIK, P.A.; KRISTENSEN, T.; WAAGBØ, R.; ROSSELAND, B.O.; TOLLEFSEN, K.E.; BAEVERFJORD, G.; BERNTSSSEN, M.H. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to water hyperoxic conditions during smoltification. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v.141, p.314-323, 2005.

OMENA, C.M.B.; MENEZES, M.Ê.S.; CARVALHO, C.M.; SILVA, J.M.; OLIVEIRA, M.B.F.; MIRANDA, E.C.; PINHEIRO, D.M.; ALENCAR, S.M.; SANTANA, A.E.G. Reflexos da utilização de farelo de coco sobre o valor nutricional do filé de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.674-679, 2010.

ONO, E.A; KUBITZA, F. **Cultivo de peixe em tanques-rede**. Jundiaí: Revisada e ampliada, 2003. 112p.

PEIXE BR. **Anuário Peixe BR da Piscicultura**, 2018.

PEREDA, J.A.O.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.D.F.; PERALES, L.D.L.H., CORTECERO, M.D.S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: life history and biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, 1999.

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

RANZINI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.89-120.

RAPOPORT, S.I.; RAMADAN, E.; BASSELIN, M. Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.96, p.109-113, 2011.

- RAŠKOVIĆ, B.S.; STANKOVIĆ, M.B.; MARKOVIĆ, Z.Z.; POLEKSIĆ, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, v.56, p.87-100, 2011.
- REECE, W.O. **DUKES: fisiologia dos animais domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 942p.
- REIFEL, C.W.; TRAVILL, A.A. Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in ten teleostean species. **Journal of Morphology**, v.162, p.343-360, 1979.
- RIBEIRO, R.P. Espécies exóticas. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMAN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. p.91-121.
- ROTTA, M.A.; QUEIROZ, J.F. **Boas práticas de manejo (BPMs) para produção de peixes em tanques-rede**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 27p.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.
- SÄNGER, A.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I. A (Ed.). **Fish physiology - Muscle Development and Growth**. Elsevier, 2001. p.187-250.
- SARKER, P.K.; KAPUSCINSKI, A.R.; LANOIS, A.J.; LIVESEY, E.D.; BERNHARD, K.P.; COLEY, M.L. Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **PLoS One**, v.11, e0156684, 2016.
- SCHWARZ, K.K.; RAMOS, A.C.; SCHLOTTAG, B.B.; LUZ, M.N.M.; ROCHA, T.A.R.; SILVA, C.H. Probiótico, prebiótico e simbiótico na nutrição de alevinos de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v.21, p.43-51, 2016.
- SCORVO FILHO, J.D.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; ALVES, J.M.C.; SOUZA, F.R.A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.112-118, 2010.
- SEBASTIÃO, F.A.; NOMURA, D.; SAKABE, R.; PILARSKI, F. Hematology and protective performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.282-289, 2011.

- SILVA, F.V.; SARMENTO, N.L.A.F.; VIEIRA, J.S.; TESSITORE, A.J.A.; OLIVEIRA, L.L.S.; SARAIVA, E.P. Características morfológicas, rendimento de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias-do-nylo em diferentes faixas de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1407-1412, 2009.
- SILVEIRA, U.S; LOGATO, P.V.R; PONTES, E.C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, p.1001-1017, 2009.
- STEVANATO, F.B.; ALMEIDA, V.V.; MATSUSHITA, M.; OLIVEIRA, C.C.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Fatty acids and nutrients in the flour made from tilapia (*Oreochromis niloticus*) heads. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.440-443, 2008.
- TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v.37, p.51-70, 1997.
- TOCHER, D.R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture**, v.449, p.94-107, 2015.
- TORRES, R.G.A.; GONZALEZ, P.S.; PENA, S.E. Anatomical, histological and ultrastructural description of the gills and liver of the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Morphology**, v.28, p.703-712, 2010.
- VEDOY, C.G.; BENGTSON, M.H.; SOGAYAR, M.C. Hunting for differentially expressed genes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.877-884, 1999.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.64, p. 655-671, 2000.
- VICENTINI, C.A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; BOMBONATO, M.T.S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S.G.; SANTOS, A.S. Morphological study of the liver in teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**, v.23, p.211-216, 2005.
- WANG, M.; LU, M. Tilapia polyculture: a global review. **Aquaculture Research**, p.1-12, 2015.

WILSON, J.M.; CASTRO, L.F.C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: GROSELL, M.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. (Eds). **Fish Physiology: The multifunctional gut of fish**. New York: Academic Press, 2011. p.2-55.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aquicultura**, v.9, p.15-21, 1999.

II. OBJETIVOS GERAIS

A seguinte pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do simbiótico FLORAFIX[®] no desempenho zootécnico, resposta hematológica, morfologia e histologia hepática e intestinal, qualidade do filé e na expressão gênica dos juvenis de tilápias do Nilo, variedade Tilamax, criadas em tanques-rede.

III. FLORAFIX[®] symbiotic additive and its influence on the performance and physiological parameters of Nile tilapia, raised in net-tanks

Abstract - The objective of this work was to evaluate the FLORAFIX[®] symbiotic effect on animal performance, hematological response, morphology and hepatic and intestinal histology, fillet quality and gene expression of Nile tilapia, variety *GIFT/TILAMAX*, raised in net-tanks. The experiment was carried out from May to November 2016, during 210 days using 3300 Nile Tilapia with average weight of 60.18 ± 8.44 g, distributed in 30 net-tanks of 1.0 m³. The animals were fed with an extruded commercial feed. The treatments consisted of a control and four treatments with the FLORAFIX[®] inclusion of 6.25; 12.50; 18.75 and 25.0 g/25kg of ration. The glucose values were significantly higher (101.30 ± 30.45 mg.dL⁻¹) for animals receiving diet with the highest symbiotic dosage, in relation to those who received the control ration (69.14 ± 17.08 mg.dL⁻¹) or diets containing lower additive dosages (62.85 ± 15.29 ; 65.97 ± 13.11 and 72.59 ± 15.59 mg.dL⁻¹). However, for the other parameters, no statistical difference was observed when contrasting the different symbiotic inclusion levels and control. Then, it can be concluded that the symbiotic use in the concentration of 25.00g/25 kg of ration, showed significant changes in glucose concentration and none of the other used dosages interfered in animal performance, health and well-being of the fish used in this work.

Index terms: blood parameters, glucose, *Oreochromis niloticus*, symbiotic, tilapia culture.

Aditivo simbiótico FLORAFIX[®] e sua influência no desempenho e nos parâmetros fisiológicos de tilápia do Nilo, criadas em tanques-rede

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do simbiótico FLORAFIX[®] no desempenho zootécnico, resposta hematológica, morfologia e histologia hepática e intestinal, qualidade do filé e na expressão gênica dos juvenis de tilápia do Nilo, variedade *GIFT/TILAMAX*, cultivadas em tanques-rede. O experimento foi no período de maio a novembro 2016, com a duração de 210 dias e foram utilizados 3300 juvenis de tilápia do Nilo com peso médio de $60,18 \pm 8,44$ g, distribuídos em 30 tanques-rede de 1,0 m³. Os animais foram alimentados com ração comercial extrusada. Os tratamentos consistiam um controle e quatro tratamentos com a inclusão de 6,25; 12,50; 18,75 e 25,0 g de FLORAFIX[®]/25kg de ração. Os valores de glicose foram significativamente maiores ($101,30 \pm 30,45$ mg.dL⁻¹) para os

animais que receberam a dieta contendo a maior dosagem do simbiótico, em relação a aqueles que receberam a ração isenta ($69,14 \pm 17,08 \text{mg.dL}^{-1}$) ou com dietas contendo menores dosagens do aditivo ($62,85 \pm 15,29$; $65,97 \pm 13,11$ e $72,59 \pm 15,59 \text{mg.dL}^{-1}$). No entanto, para os demais parâmetros, nenhuma diferença estatística foi observada ao contrastar os diferentes níveis de inclusão do simbiótico e o controle. Desta forma, podemos concluir que a utilização do simbiótico na concentração de 25,00g/25 kg de ração, apresentou alterações significativas na concentração da glicose e nenhuma das demais dosagens utilizadas interferiu no desempenho zootécnico, na saúde e bem-estar dos peixes utilizados neste trabalho.

Termos para indexação: parâmetros sanguíneos, glicose, *Oreochromis niloticus*, simbiótico, tilapicultura.

Introduction

The world fish production achieved in 2016 a total of 171 million tons, of which 88% were for human consumption, consequently the per capita consumption increased, registering 20.3 kg in the year of 2016 (FAO, 2018). Brazilian fish farming produced 697 thousand tons of fish in 2017, values that are 8% higher than the previous year. Tilapia is the most cultivated species in Brazil, representing 51.7% of the total produced (Peixe BR, 2018).

The production systems intensification needs to use better formulated rations. However, the ration cost is one of the main barriers faced by fish farmers and may represent 70% of total cost. For higher activity profitability, productive strategies have been sought to reduce the food costs, causing a direct positive effect on the fish productive chain (El-Sayed, 2006). Moreover, it is of greatest importance to replace the chemicals products by the natural ones, such as additives, which can improve health and growth, reduce the risk of animals, humans and the environment contaminations and reduce production costs.

As alternative, food additives, such as probiotic, prebiotic and symbiotic that are composed of one or more microorganism cultures that benefit the host's health through the intestinal microbiota equilibrium (Fuller, 1989; Sanders, 1998; Gatesoupe, 1999; Irianto & Austin, 2002; Azevedo et al., 2016), can be added to diet, because they are able to modify or manipulate microbial communities, increase growth and survival of farming species (Horowitz & Horowitz, 2000; Azevedo et al., 2016).

The combination of prebiotics + probiotics in food forms the "symbiotic" (Collins & Gibson, 1999), being classified as functional and nutraceuticals foods, which make the

replacement and stimulation of the natural flora, benefiting the gastrointestinal tract; they also stimulate bacteriocins production (natural antibiotic) and other compounds that inhibit undesirable microorganisms' growth to the host.

The symbiotic inclusion in food is a viable and safe alternative in aquaculture, to prevent diseases (Mattar et al., 2001) and may replace or reduce the antibiotics use (Nikoskelainen et al., 2001; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Nayak, 2010). Then the aim of this work was to evaluate the FLORAFIX[®] symbiotic effect on animal performance, hematological response, morphology and hepatic and intestinal histology, fillet quality and the gene expression of Nile tilapia, variety *GIFT*, raised in net-tanks.

Material and Methods

The experimental procedure was approved by the Ethical Conduct Committee in the Use of Experimental Animals (CEAE) of the Maringá State University (UEM), according to CEUA 4244140516 protocol.

Animals and facilities

A total of 3300 Nile tilapia, variety GIFT/TILAMAX (*Genetic Improvement of farmed Tilapia*) reverted sexually were used. Animals with an average weight of 60 g were distributed in 30 net-tanks of 1 m³ (1.0 x 1.0 x 1.2 m high) of usable volume. Each net-tank had galvanized steel mesh coated with PVC, with 20 mm of aperture, suitable floating buoys, with circular feeders, covered with the same material, totaling 110 animals per net-tank, being this considered as an experimental unit.

The experiment was carried out in the demonstration unit of net-tanks production at the Rosana reservoir in the Corvo tributary river, Diamante do Norte municipality-Paraná (22°39' S; 052°46' W) from May to November of 2016, during 210 days.

Diets and Treatments

The fish were fed with extruded commercial rations, three times a day (08:00, 13:00 and 17:00 hours), with 32% of crude protein and with diameter from 4 to 8 mm depending of the growth phase. The fish were manually fed with 3% of the fish average biomass in tanks.

The treatments were a basal diet added with FLORAFIX[®] additive: manufactured with mix of prebiotic + probiotic (Table 1). Five treatments were tested, and they were: T1

(control), T2: 6.25 g, T3: 12.50 g, T4: 18.75 g and T5: 25.00 g of FLORAFIX[®] added to each 25 kg of ration. The symbiotic was previously diluted in 50 ml of soybean oil and then added to ration, with the aid of an electric mixer. The commercial ration of control treatment was also homogenized in soybean oil.

The ration (Table 2) was formulated to meet the nutritional requirements recommended in the Brazilian Table for Tilapias Nutrition (Furuya et al., 2010). Monthly, biometrics measurements (weight and length) were carried out from fish sampling to evaluate the performance.

Productive performance and body composition

To determine the production performance indexes, at the beginning and end of the experiment, all fish were desensitized in eugenol with the dose of 75.0 mg. L⁻¹ (Deriggi et al., 2006), then the weight (g) and the total length (cm) were recorded.

The animal performance data analyzed were: slaughter weight (g), fillet weight (g) and fillet yield (%).

Physical and chemical parameters of the water

The temperature and dissolved oxygen were recorded using a portable meter (YSI Model 55 Dissolvedoxygen, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA), and the temperature was monitored daily (10 am and 5pm).

Blood parameters

At the end of the experimental period, blood collection of six fish from each experimental unit was collected, randomly captured and anesthetized with benzocaine (1 g/10 mL of alcohol/10 L of water), totaling 36 animals per treatment. 4 mL of blood was collected by puncturing the caudal vein with the aid of disposable syringes, and the bleeding time of each animal lasted approximately 50 seconds.

The blood tests were done at the Clinical Biochemical Lab of the UEM Clinical Analysis Department. To evaluate the glucose plasma levels, the glucose GOD-FS (Diasys, Diagnostic Systems International, Germany) test was used, based on the enzyme photometric methodology, according to the manufacturer's instructions. Half of the collected blood was used for glucose plasma and hematocrit analysis and the other half for serum cortisol analysis.

For plasma separation, the 2 mL aliquot was placed in a tube containing fluorinated EDTA, then centrifuged for 10 minutes at 2,500 rpm and collected the supernatant, corresponding to the plasma, being half of the plasma frozen in liquid nitrogen, to glucose analysis and the other part used to read the hematocrit. The serum was gotten after submersion of the blood samples in the water bath at 37°C for 10 minutes, followed by centrifugation at 2,500 rpm for 10 minutes and supernatant collection (serum), for cortisol analysis then subsequently stored in liquid nitrogen.

The serum cortisol concentration analysis was made from microparticle immunoassays by chemiluminescence (CMIA), using the equipment Architect 8200 (AbbottLaboratories, Abbott Park, Ill, USA), with reagent kit of the same brand.

The hematocrit (Htc) percentage was determined by the Microhematocrit method, according to Goldenfarb et al. (1971), the values found were expressed in percentage of the blood total volume.

Gene expression

At the end of the experiment, six fish from each treatment were euthanized in benzocaine superdosage (1g/10 mL of alcohol/10 l of water) followed by section of the cervical medulla (Stoskopf, 1993), for samples collection. To evaluate the gene expression of catalase (CAT), glutathioneperoxidase (GPX) and glutathionesynthase (GSS), approximately 2 g of white muscle of six fish from each treatment (n = 6) were collected. The samples were stored immediately in liquid nitrogen until the analysis.

The total RNA was extracted using the Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) according to the manufacturer's manual, in the proportion of 1 mL for each 100 mg of tissue. All materials used were previously treated with RNase inhibitor-RNase AWAY[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The total RNA concentration was measured using spectrophotometer PICODROP[®] (PicodropLimited, Hinxton, United Kingdom). RNA integrity was evaluated in 1% agarose gel, stained with SYBR Safe[™] DNA gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and visualized in a transluminary device with ultraviolet light.

To remove possible genomic DNA residues, RNA samples were treated with Quanti Novag DNA Removal Mix (Qiagen GmbH, hilden, Germany) at 45°C for 2 minutes, according to manufacturer's manual. After genomic DNA removal, 5 µg of RNA for cDNA

synthesis were used, using the QuantiNova Reverse Transcription kit (Qiagen GmbH) in accordance with manufacturer's standards. In sterile tube were added 5 µg of total RNA, 1 µl of QuantiNova Reverse Transcription Enzyme and 4 µl of QuantiNova Reverse Transcription Mix. The reverse transcriptase reaction was incubated for 3 min to 25°C, followed by 45°C for 10 min and subsequently inactivation for 5 min at 85°C, being immediately placed on ice. The samples were stored at -20°C until the analysis.

qPCR analyses were conducted using a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and the QuantiNova SYBR Green PCR kit, in duplicates. A total volume of the reaction of 20 µl was used, containing 10 µl of 2x SYBR Green PCR Master Mix, 2 µl of QN Rox Reference Dye, 0.8 µl of each primer (400 nM), 5 µl CDNA (400 ng) and 1.4 µl of RNA sefreewater.

qRT-PCR reactions were initially incubated at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of: denaturation at 95°C for 5 seconds, ringing/extension 60°C by 10 seconds. The dissociation curves (*melting curve*) were carried out to determine the reactions specificity.

To evaluate by real-time PCR (qRT-pcr) primers from GPX, GSS and CAT genes were drawn according to the sequences deposited on the www.ncbi.nlm.nih.gov site for *Oreochromis niloticus*, using the www.idtdna.com site (Table 3). For endogenous control, the β-actin gene was used, adopting the primer developed by Yang et al. (2013).

For qRT-PCR reactions, the fluorescent Dye SYBR[®] GREEN PCR Master Mix (Applied biosystems, USA) was used, according to the manufacturer's manual. All analyses were performed on a volume of 25 µl and in duplicates. The reactions were conducted on strips in the Step One Plus unit. The concentrations of primer and cDNA were determined through efficiency tests using three primer concentrations (100, 200 and 400 nM) and four cDNA concentrations (10, 100, 200 and 400 ng).

The qRT-PCR results were transformed as suggested by Coble et al. (2011), calculating the adjusted Cyclethreshold (ct): $\text{adjusted ct} = 40 - [(\text{average Ct of target gene}) + (\text{median CT of endogenous gene} - \text{medium Ct of endogenous gene}) \times (\text{target gene slope} / \text{endogenous gene slope})]$.

The primers for genes analyzed in this study proved to be suitable for PCR in real time analysis. The amplification efficiency was similar to the genes of interest, ranging from 90 to 110%. The dissociation curves analysis showed no presence of non-specific products or dimers of primers formation, demonstrating the data reliability in the mRNA expression of the

evaluated genes. Statistical analysis of B-actin as endogenous control showed no significant difference among treatments, proving the efficiency of its use as endogenous control.

Lipid oxidation analyses (Tbars), hydrogen potential (pH), color, water retention capacity (CRA) and fillets chemical composition

To evaluate quality and properties attributes of fillets a total of 18 fish per treatment were euthanized with benzocaine superdosage (1g/10 mL of alcohol/10L of water) followed by cervical medulla section (Stoskopf, 1993), and fillet samples were collected for the following parameters characterization: Tbars, texture, pH, color, CRA and bromatological composition. The pH, color and CRA analyses were carried out in refrigerated samples, while the Tbars, texture and bromatological composition were performed from frozen samples.

For lipid oxidation evaluation of fish meat, the Tbars was analyzed at 7, 14 and 21 days after slaughter, in frozen samples. The reactive substances to thiobarbituric acid resulting from lipid oxidation were determined according to Raharjo et al. (1992) method, with modifications by Pereira (2009).

The pH was measured by direct gauging in fillet muscle in triplicate, 36 hours post-mortem, using a portable digital potentiometer Toledo Mettler (model 1140, Mettler-Toledo, Woburn, MA), with insertion electrode for meats.

The luminosity measurements were performed 36 hours *post-mortem*, on the fillet ventral face by taking six different reading points per sample. The brightness values (L^*) were evaluated using a colorimeter (MINOLTA CR-10 model; Minoltac Camera Co., Osaka, Japan), at 90° angle, at room temperature, where L^* sets the luminosity ($L^* = 0$ black and $L^* = 100$ White) and b^* (yellow-blue component).

The analysis of water retention capacity (CRA) was performed according to Lankhmanan et al. (2007). Samples of 1 g of raw muscle in triplicate were weighed in analytical scales (Shimadzu AUY-220, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), placed in 1.5 mL tubes fitted with filter paper. The tubes were centrifuged at 1,500 RCF (3,660 rpm) for four minutes at 4°C in centrifugal Eppendorf (model 5430R, Eppendorf North America, Inc., New York, USA). The samples were weighted after centrifugation and dried in oven (model Orion 515, fanem, Sao Paulo, Brazil) at 70°C for 12 hours. After that period, the dried samples were again weighed. For the CRA calculation the following formula was used:

$$CRA\% = \frac{PAPC - PAS}{PAI} \times 100$$

in which, PAI is the sample initial weight; PAPC is the sample post-centrifugation weight and PAS corresponds to the dry sample weight.

For chemical composition analysis, the fish muscle composition was evaluated. The samples were initially dehydrated in oven at 55°C for 24 hours and ground in Knife-type grinder. To determine moisture content, crude protein and ash were carried out analyses in triplicate following the methodology of AOAC (2005) and for total lipids extraction it was used the Bligh & Dyer (1959) method. The analyses were carried out at the Animal Food and Nutrition Laboratory (LANA) at Maringá State University.

Hepatic and intestinal histology

At the end of the experimental period, 18 fish per treatment were euthanized in benzocaine superdosage (1g/10 mL of alcohol/10L of water) followed by cervical medulla section (Stoskopf, 1993), to collect samples from the median portion of the liver left lobe and intestine middle portion for histological exams.

After washing with physiological solution (NaCl 0.9%) The liver samples were fixed in aqueous Bouin solution (Behmer et al., 1976) and then transferred to vials containing alcohol 70°. The samples were dehydrated by increasing series of alcohols, diaphanized in xylol and included in paraffin. The LEICA rotary microtome, available in the Animal Histological Laboratory in the Morphological Sciences Department of the Maringá State University, was used to obtain semi-serials transverse cuts of 6 µm thick.

To liver morphometric analysis were used the periodic acid of Schiff (PAS) + hematoxylin immunohistochemistry techniques (Beçak & Paulete, 1976), for intracellular glycogen evidence and percentage determination occupied by this inclusion by area, were carried out images captured in Olympus BX41 optical microscope coupled with camera QColor 3 Olympus, using objective of 40x in 05 images per cut, totaling 450 images/treatment. These measurements were done using the Image Pro Plus[®] analysis software (version 4.5, Media Cybernetics, USA).

To intestinal analysis it was removed a segment of 3.0 cm, away 3.0 cm from pylorus. After removal the segment was sectioned in the longitudinal direction and the ends were attached to a rectangular styrofoam base, in order to keep the villi exposed. Each intestinal

fragment was placed in a vial with Bouin solution, in which they were fixed for 12 hours. The latter preservation was done in alcohol 70° until the time of routine histological processing. The intestines were cut into sections of 0.5 cm and prepared according to the usual technique of histotechnology to obtain paraffin cuts with 3 µm thick and then they were stained with Hematoxylin-eosin (HE), in the Animal Histological Laboratory at the Morphological Sciences Department of UEM.

The villus total height measurements corresponded to the distance from the villi apex to the beginning of the muscular layer and the villi width were also measured.

These measures procedures were carried out from images captured in Olympus BX41 optical microscope coupled with camera QColor 3 Olympus, using 20x objective in 05 images per cut, totaling 450 images/treatment. These measurements were done using the Image Pro Plus[®] analysis software (version 4.5, Media Cybernetics, USA).

Statistical analysis

All tests were compared at the 5% of significance. The contrasts were performed among all levels and then the regression analysis. The glucose variable did not present normal distribution and therefore, the methodology of generalized linear models considering gamma distribution with inverse binding function was performed. Data analysis were performed using the R program (R Development Core Team, 2016).

Results and Discussion

The water quality parameters (temperature, pH and dissolved oxygen) presented average values according to the ideal for appropriate growth and welfare conditions of the species, as recommended in CONAMA 357/05 resolution for internal waters. As suggested in the scientific literature, animals grown in waters with temperatures ranging from 24 to 30°C are among the ideal values for the thermal comfort of the species (El-Sayed, 2006), as well as oxygen content dissolved above 4 mg.L⁻¹ and basic pH (Popma & Lovshin, 1996).

The animal performance parameters results, analyzed during the 210 days of the experiment, varied from 844.36 to 746.44 for slaughter weight (g); from 299.44 to 268.89 for fillet weight (g) and for fillet yield (%) from 35.30 to 35.95. As well as in works carried out by Fabregat (2006), Aly et al. (2008) and Tachibana et al. (2011), using juvenile Nile tilapia, no statistical difference was observed in the weight, fillet yield and in the gene expression of

the antioxidant system genes when comparing animals fed with or without symbiotic (MOS + *Bacillus subtilis*) use. The data of the tilapia fillet composition analyzed for humidity (%), fat (%), caloric value, crude protein, ash and carbohydrate (Table 6) of this work show that there was no significant difference ($P > 0.05$) in the results.

On the other hand, when testing *Bacillus subtilis* (2 g.Kg^{-1}) and mannanoligosaccharides (2 g.Kg^{-1}) and their combination (symbiotic) for Nile tilapia fingerlings, Azevedo et al. (2016) found higher weight gain. Nekoubin et al. (2012) also reported the symbiotic beneficial effect, verifying higher final weight and weight gain in Acará bandeira (*Pterophyllun scalare*) when fed with 0.75 g.kg^{-1} of the symbiotic (Biomim Imbo[®]).

The animal parameters and fillet quality results are within the values considered normal for tilapia farming in net-tanks, not differing between the fish that received the symbiotic product and the control group. However, it should be noted that the normal values observed in the current study may also be related to the proper management, the lot uniformity and the water quality in which the animals remained as well as the diet supplied according to the requirements of the species. Reports and experiments show that the additives require some stressor to demonstrate the beneficial effects on the immune response.

This fact may have been due to the good management conditions, in which the tilapias were farming. The use of symbiotic in aquaculture can be favorable when the aquaculture environment is affected by some stressful agent.

The gene expression values of the antioxidant system also did not present significant changes, probably due the fact that the water temperature was within the appropriate parameters for tilapia farming. Corroborating with studies that demonstrated that the abrupt temperature variation of the growing water can influence the expression of genes that control the hyperplastic and hypertrophic development and muscular growth of the musculature (Rescan, 2001; Johansen & Overturf, 2005).

Studies of liver histopathology and hematologic analyses have great relevance in tilapias researches, because they are associated with the development of structural and cellular changes, which can interfere with fish health and performance (Honorato et al., 2013; Ranzani-Paiva et al., 2013). In this way, the livers macroscopic evaluation showed in general, that the organs were well developed, the two lobes were well-defined, with light brown and bright color being considered as a normal standard or teleost fish (Roberts, 1981). In the case of microscopic analyses, no statistical difference ($P > 0.05$) was observed in relation to the

hepatocytes presence and glycogen percentage when comparing treatments and control group. The absence of changes in liver morphology and microscopy analysis is indicative that the symbiotic use in the evaluated dosages did not influence liver metabolic functions.

The intestinal analysis showed that total height, mucosa villi width (Table 4) and structural constituent of the mucous villi epithelium (Figure 2), showed no significant differences ($P < 0.05$) in fish fed with the additive when compared to the control group. Unlike the one observed in the present work, Medri et al. (1999) and Mello et al. (2013) obtained significant results by comparing the same intestinal analyses of fish fed with symbiotic and the control group.

The variations observed in the articles are justified by the data obtained in relation to the studied species, age of the animal, type of symbiotic used, viability of microorganisms to be aggregated to the rations and their storage conditions. According to Faria et al. (2009), various aspects such as inadequate dosage of microorganisms, lack of health challenge in experimental conditions and a possible competition with the host by nutrients, may contribute to the non-expression of favorable responses in performance when used live microorganisms.

The fish hematological pattern in function of the symbiotic use has not been altered (Table 5), being according to values observed in other works that used the same species studied in the present work (Ishikawa et al., 2007; Barros et al., 2009; Harikrishnan et al., 2010). Although they have not shown significant differences ($P < 0.05$) among treatments, the hematocrit values are slightly elevated in relation to the reference values (27.85 ± 1.65), described by Ueda (1997).

The cortisol concentrations were normal (Table 5), when compared to the reference values described by Wedemeyer et al. (1990), which determined that cortisol basal concentrations in fish at rest should be less than $40 \mu\text{g/dL}^{-1}$. Coinciding with values (16.43 to $46.32 \mu\text{g/dL}^{-1}$) found by Barcellos et al. (1999) and Sanches (2013). According to Summers et al. (2006), when stressed, fish can present an increase of about four times in cortisol values. Cortisol and glucose plasma values can vary with the type and duration of stress (Mommsen et al., 1999; Barton et al., 2002).

Such affirmations, are in accordance with the studies carried out by Lara-Flores et al. (2003), in which was tested a commercial probiotic containing a mixture of *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* bacteria for Nile Tilapia. Such authors found that the red series parameters did not vary throughout the study. It is known that the haematological

parameters of the red series are related to the general state of fish health, the normal cortisol levels in tilapias can be related to the hypothesis referring to the increase in the energy availability for metabolic support (Gonçalves et al., 2011) reestablishing homeostasis.

Glucose is a monosaccharide type carbohydrate and is one of the most important as a primary energy source for most organisms, besides being part of important metabolic pathways, being in constant flux (Bergot, 1979; Wilson & Poe, 1987; Hemre et al., 1996; Gouveia & Davies, 2004). In the present work, the glucose levels in fish that received the highest symbiotic additive dosage varied significantly ($P < 0.05$), presenting high concentration in fish from this treatment (Table 5). The glucose increase indicates higher energy consumption and as a consequence higher metabolic efficiency in amino acids, proteins and lipids production. Additionally, to higher stress control, it is an important factor for animals' growth and health (Lovell, 1998).

Glucose and cortisol are the most commonly used reference indicators for evaluating the fish stress raised in net-tanks. The dosage of blood glucose is considered a valuable method to diagnose the physiological stress occurrence (Wendelaar Bonga, 1997), increasing its level in the presence of some stressful factor, to supply the highest energy demand (Morgan & Iwana, 1997).

The average glucose values ($101.30 \pm 30.45 \text{ mg.dL}^{-1}$) were significantly higher for animals receiving diets with the highest symbiotic dosage, in relation to those that received the control ration ($69.14 \pm 17.08 \text{ mg.dL}^{-1}$) or with diets containing lower additive dosages (62.85 ± 15.29 ; 65.97 ± 13.11 and $72.59 \pm 15.59 \text{ mg.dL}^{-1}$), suggesting that individuals had their homeostasis modified, altering its physiological responses in an attempt to adapt to this condition of possible food stress. The cortisol release should not be necessarily related to glucose, since the first occurs by the inter-renal cells' activity and by the stimulation to increase the blood glucose, besides the cortisol stimulation, and also the catecholamines action released by chromaffin cells stimulation (Perry et al., 1991; Fritsche et al., 1993).

In accordance with the results presented by Martins (2000), in this experiment the cortisol release also appears to have been blocked, the increase in blood glucose must have occurred thanks to stimulation by catecholamines. The glucose values observed in the current study are within those recommended as reference 39 to 96 mg.dL^{-1} for Tilapias raised in intensive systems, described by Hrubec et al. (2000), with the exception of the treatment that received the highest active dosage.

It is worth noting that the blood cells show great variation in the counting values depending on the factors as water quality, nutritional status and farming system (Tavares-Dias and Moraes, 2004). Therefore, the values comparison in general are carried out in relation to the fish control group and those of the treatment groups in the experiment itself. In this way, even if there are no differences in the primary stress indicator (cortisol) for the different treatments, the hyperglycemia observed in the treatment with higher dosage is a possible response to stress, because glucocorticoids, corticosteroids and catecholamines can raise the blood sugar level (Tejpal et al., 2009), as a consequence there is the release of liver glucose, which is the main reserve carbohydrate of fish (Lima et al., 2006).

Thus, an aquaculture system that presents the ideal conditions for good fish performance (nutritional, sanitary and water quality management) is not necessary to use symbiotic, since contact with pathogenic microorganisms is minimal.

Conclusion

It is concluded that the additive with symbiotic in the concentration of 25.00 g/25 kg of ration, showed significant results in glucose concentration. It can also be concluded that the symbiotic use did not interfere with animal performance in this work.

Acknowledgments

To the company SLO Biotecnologia & Agropecuária for funding the research project.
Coordination of Personal Improvement of Higher Education (CAPES), for the support.

References

- ALY, S.M.; AHMED Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.128-136, 2008.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005.
- AZEVEDO, V.R.; FILHO, F.C.J.; PEREIRA, L.S.; CARDOSO, D.L.; JÚNIOR, V.V.M.; ANDRADE, R.D. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de

tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.9-16, 2016.

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, 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, p.895-903, 2009.

BARTON, B.A.; MORGAN, J.D.; VIJAYAN, M.M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: ADAMS, S.M. (ed.). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Bethesda: American Fisheries Society, 2002. p. 289-320.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 574p.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FERITASNETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Manole, 1976. 239p.

BERGOT, F. Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.64, p.543-547, 1979.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

COBLE, D.J.; REDMOND, S.B.; HALE, B.; LAMONT, S.J. Distinct lines of chickens express different splenic cytokine profiles in response to *Salmonella* Enteritidis challenge. **Poultry Science**, v.90, p.1659-1663, 2011.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.1052-1057, 1999.

DERIGGI, G.F.; INOUE, L.A.K.A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.28, p.269-274, 2006.

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

FABREGAT, T.E.H.P. **Utilização do prebiótico Flavofeed® como suplemento dietário para juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2006. 42p. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)**. Roma. 2018.

FARIA, D.E.; HENRIQUE A.P.F.; FRANZOLIN NETO, R.; MEDEIROS A.A., JUNQUEIRA, O.M.; FARIA FILHO, D.E. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. Probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.18-28, 2009.

FRITSCH, R.; REID, S.G.; THOMAS, S.; PERRY, S.F. Serotonin-mediated release of catecholamines in the rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, v.178, p.191-204, 1993.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; BOSCOLO, W.R.; CYRINO, J.E.P.; FURUYA, V.R.B.; FEIDEN. A. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010. 100p.

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

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.

GONÇALVES, A.T.; MAITA, M.; FUTAMI, K.; ENDO, M.; KATAGIRI, T. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v.77, p.633-642, 2011.

GOUVEIA, A.; DAVIES, S.J. Modulation of the post-prandial plasma glucose profile in juvenile european sea bass *Dicentrarchus labrax* fed diets varying in starch complexity. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.35, p.392-400, 2004.

HARIKRISHNAN. R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M.S. Supplementation diet containing probiotics, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina*

mrigala Against *Aphanomyces invadans*. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v.4, p.1-11, 2010.

HEMRE, G.L.; WAAGBO, R.; HJELTNES, B.; AKSNES, A. Effect of gelatinized wheat and maize in diets for large Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) on glycogen retention, plasma glucose and fish health. **Aquaculture Nutrition**, v.2, p.33-39, 1996.

HONORATO, C.A.; ASSANO M.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J.; MACHADO, M.R.F. Histologia do intestino de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Nucleus Animalium**, v.5, p.103-111, 2013.

HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. Efficacy of probiotics in growout systems. **The advocate**, v.3, p.12, 2000.

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.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.333-342, 2002.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; FERREIRA, C.M. Hematological parameters in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.619-626, 2007.

JOHANSEN, K.A.; OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Biotechnology**, v.7, p.576-587, 2005.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v.274, p.1-14, 2008.

LANKHMANAN, R.; PARKINSON, J.A.; PIGGOTT, J.R. High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). **LWT - Food Science and Technology**, v.40, p.544-551, 2007.

LARA-FLORES, M.; OLEVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B.E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, p.193-201, 2003.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; MELO, D.C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, p.113-117, 2006.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 260p.

MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887, estressados**. 2000. 125p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MATTAR, A.F.; DRONGOWSKI, R.A.; CORAN, A.G.; HARMON, C.M. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery International**, v.17, p.265-268, 2001.

MEDRI, V.; PEREIRA, G.V.; LEONHARDT, J.H.; PANINI, M.S.; DIETZEL, S. 1999. Avaliação sensorial de filés de tilápias alimentadas com diferentes níveis de levedura alcooleira. **Acta Scientiarum**, v.21, p.303-308, 1999.

MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G.; MORAES, F.R.; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; ENGRACIA FILHO, J.R.; CLAUDIANO, G.S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.724-730, 2013.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p.211-268, 1999.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. *In*: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. New York: Cambridge University Press, 1997. p.247-270.

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

NEKOUBIN, H; HATEFI, S; JAVAHERY, S; SUDAGAR, M. Effects of Synbiotic (*Bioimin Imbo*) on growth performance, survival rate, reproductive parameters of angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Walailak Journal of Science and Technology**, v.9, p.327-332, 2012.

NIKOSKELAINEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G.; OUWEHAND, A.C. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of

infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2430-2435, 2001.

PEIXE BR. **Anuário Peixe BR da Piscicultura**, 2018.

PEREIRA, M.G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

PERRY, S.F.; FRITSHE, R.; KINKEAD, R.; NILSSON, S. Control of catecholamine release *in vivo* and *in situ* in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hypoxia. **Journal of Experimental Biology**, v.155, p.549-566, 1991.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University, 1996. 23p. (Research and development, 41).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.2182-2185, 1992.

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

RESCAN, P.Y. Regulation and functions of myogenic regulatory in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p.1-12, 2001.

ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi Prensa, 1981. 467p.

SANCHES, F.H.C. **Resposta de estresse à substância de alarme na tilápia-do-Nilo**. 2013. 24p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.

STOSKOPF, M. Anaesthesia. In: BROWN, L. (ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. London: Pergamon Veterinary Handbook Series, 1993. p.161-168.

SUMMERS, C.H.; WINBERG, S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.4581-4589, 2006.

TACHIBANA, L.; DIAS, D.C.; ISHIKAWA, C.M.; CORREA, C.F.; LEONARDO, A.F.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Probiótico na alimentação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758), durante a inversão sexual: desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. **Bioikos**, v.25, p.25-31, 2011.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004. 144p.

TEJPAL, C.S.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, J.A.; MUTHAPPA, N.A.; VIDYA, S.; RAJAN, M.G. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. **Aquaculture**, v.293, p.272–277, 2009.

UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (*Cichlidae, Teleostei*) - Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, p.270-275, 1997.

WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.; MC LEAY, D. Stress and acclimation. In: SCHERECK, C.B.; MOYLE, P.B. (Ed.). **Methods for fish biology**. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 1990. p.451-489.

WENDELAAR BONGA, S.E. The Stress Response in Fish. **Physiology Review**, v.77, p.591-625, 1997.

WILSON, R.P.; POE, W.E. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. **Journal of Nutrition**, v.117, p.280-285, 1987.

YANG, C.G.; WANG, X.L.; TIAN, J.; LIU, W.; WU, F.; JIANG, M.; WEN, H. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**, v.527, p.83-192, 2013.

1 **FLORAFIX[®] symbiotic additive and its influence on the performance and physiological**
 2 **parameters of Nile tilapia, growth in floating cages**

3
 4 **Table 1.** Qualitative and quantitative composition of the symbiotic micro-encapsulated
 5 symbiotic FLORAFIX[®]: prebiotic + probiotic.

COMPOSITION	CCT	%
Whey powder		24.9
Dry Yeast		20
FOS		5
Mannooligosaccharides (MOS)		5
Raffinose and Stachyose		5
Bifidobacterium longum	7202	5
Enterococcus faecium	5084	5
Lactobacillus acidophilus	3258	5
Lactobacillus plantarum	2568	5
Lactobacillus casei	0393	5
Bacillus subtilis	0089	5
Bacillus Lichiniformis	0032	5
Bacillus amyloliquefaciens	DSMZ-1006	5
Glycerol		0.1
Total		100

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16 **Table 2.** Diet Formulation.

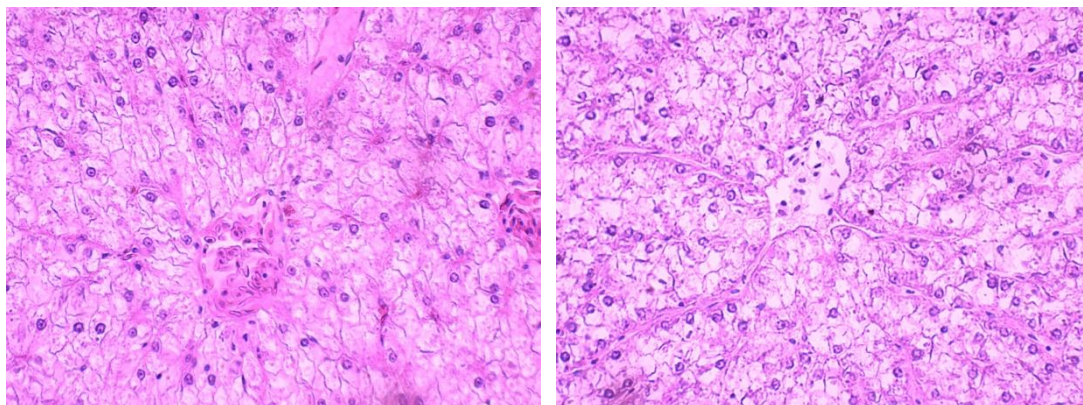
Feed	%
Corn	39.64
Soybean Meal	35.00
Viscera Meal	5.00
Rice Meal	13.00
Blood Meal (80%)	4.00
DL- methionine	0.12
Soybean Oil (without additive)	1.00
Antioxidant	0.10
Premix	0.50
Vitamin C	0.05
L-lysine	0.12
L-tryptophan	0.02
Choline chloride	0.10
Salt	0.35
Phosphorus bicalcium	1.00

17

18 **Table 3.** Characteristics of primers used in this study.

Primer	Sequence	Amplicon (pb) size	Access Number
GPX	F: CGCCGAAGGTCTCGTTATTT R: TCCCTGGACGGACATACTT	107	NM_001279711.1
GSS	F: TACCGAGCGTACAGCCTATATT R: TCACTGAGGCAGTTGCTTATTT	108	XM_003460466.3
CAT	F: CCCAGCTCTTCATCCAGAAAC R: GCCTCCGCATTGTA CTTCTT	103	JF801726.1
β -actin	F: TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG R: CTGTTGGCTTTGGGGTTCA	217	XM_003455949

19

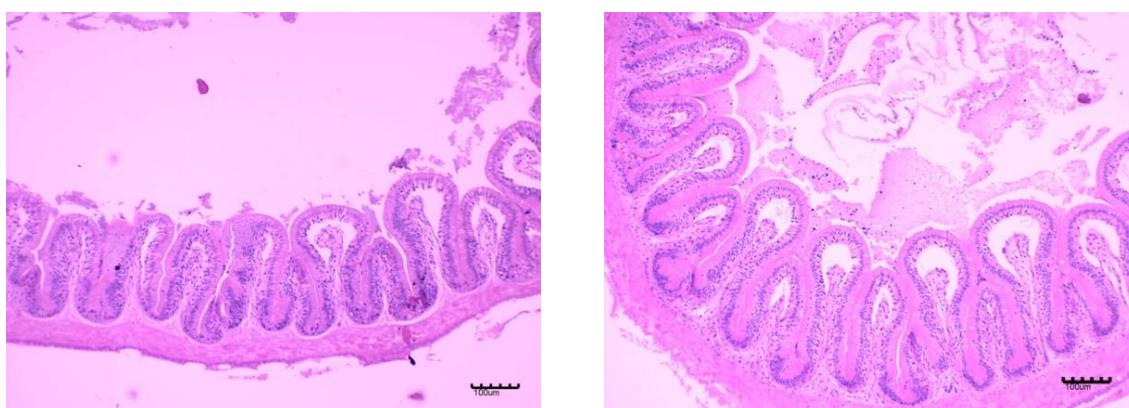


20
21 **Figure 1.** Liver of Nile tilapia Juvenile. Detail of the liver without histopathological changes.
22 Hematoxylin, objective 20x.

23
24 **Table 4.** Mean values and standard deviation observed for total villus height and width (μm)
25 of mucosa from mid-intestine portion of juvenile Nile tilapia after 210 days of feeding.

Parameters	Symbiotic Levels (g kg^{-1})				
	0	6.25	12.50	18.75	25.00
Total Villus Height	192.96 \pm 98.93	138.37 \pm 34.27	236.59 \pm 64.85	178.39 \pm 49.10	208.36 \pm 50.96
Villus Width	49.50 \pm 5.10	31.15 \pm 6.05	57.50 \pm 5.80	44.50 \pm 6.15	54.11 \pm 6.90

26
27



28
29 **Figure 2.** Intestinal wall showing the villi epithelial layer from intestines middle portion of
30 Nile tilapia Juvenile. Hematoxylin, objective 20x.

31
32

33 **Table 5.** Mean values and standard deviation of hematological and biochemical parameters of
 34 tilapia fed with increasing levels of dietary additive.

Parameters	Symbiotic Levels (g kg ⁻¹)				
	0	6.25	12.50	18.75	25.00
Hematological					
Hematocrit(%)	35.42±8.80	31.76±6.56	31.32±6.17	34.47±8.17	34.53±6.48
Biochemicals					
Glucose (mg.dL ⁻¹)	69.14±17.08	62.85±15.29	65.97±13.11	72.59±15.59	101.30±30.45*
Cortisol (µg/dL ⁻¹)	30.37±13.81	22.09±12.27	26.65±10.46	27.35±13.14	33.04±14.40

35 *different from control. Equation: $Glucose = 1 / 1.883 \times 10^{-2} - 3.44 \times 10^{-4} (Levels)$

36

37 **Table 6.** Mean values and standard deviation of the chemical composition of tilapia fillets fed
 38 with increasing levels of dietary additive.

Parameters	Symbiotic Levels (g kg ⁻¹)				
	0	6.25	12.50	18.75	25.00
Humidity (%)	76.33±0.48	76.36±1.00	76.34±1.32	76.64±0.60	77.03±0.63
Fat (%)	1.76±0.78	1.70±0.40	1.68±0.30	1.68±0.43	1.52±0.36
Caloric Value	99.55±5.14	98.84±4.37	98.89±5.70	97.97±3.65	95.73±3.72
Ashes	0.99±0.05	1.05±0.15	1.04±0.09	0.96±0.07	0.93±0.06
Carbohydrate	3.39±0.69	2.72±0.93	2.47±0.68	2.89±0.97	2.28±0.64
Crude Protein	17.52±0.61	18.16±1.06	18.47±0.75	17.82±1.09	18.23±0.78

39

40

41 **Table 7.** Mean values and standard deviation of slaughter weight, fillet weight and fillet yield
 42 of tilapia fed with increasing levels of dietary additive.

Parameters	Symbiotic Levels (g kg ⁻¹)				
	0	6.25	12.50	18.75	25.00
Slaughter weight (g)	844.36±100.39	772.89±202.37	746.44±143.88	758.22±164.49	792.06±75.38
Fillet weight (g)	299.44±31.71	284.17±60.23	268.89±58.20	268.89±57.30	284.11±34.53
Fillet yield (%)	35.51±0.94	35.30±0.52	35.86±0.87	35.51±1.59	35.95±1.23

43

44

45 **Table 8.** Mean values and standard deviation for colorimetry (CIELab), Tbars, pH and CRA
 46 and fillet gene expression of tilapia fed with increasing levels of dietary additive.

Parameters	Symbiotic Levels (g kg ⁻¹)				
	0	6.25	12.50	18.75	25.00
A	-2.498	-2.538	-2.775	-2.677	-2.624
B	0.704	0.974	1.324	1.714	0.651
L*(D65)	47.99±1.20	46.53±1.93	46.51±2.11	46.88±1.97	47.88±1.52
Tbars	0.351±0.10	0.394±0.10	0.433±0.16	0.386±0.07	0.344±0.10
pH	6.41±0.15	6.52±0.11	6.47±0.13	6.50±0.07	6.50±0.12
CRA	58.90±1.00	60.83±1.75	60.90±2.00	59.81±1.50	59.44±0.81
CAT	9.86±1.23	10.60±1.20	10.47±0.89	9.85±0.94	10.69±1.25
GPX	9.17±0.78	10.27±0.96	10.39±1.13	9.60±1.07	9.78±1.18
GSS	6.87±1.50	8.22±1.74	8.13±1.47	6.94±1.91	7.09±0.67

47 L* = luminosity (0 black and 100 white).