



**Universidade Federal do Pará - UFPA  
Instituto de Estudos Costeiros - IECOS  
Faculdade Ciências Naturais - FACIN**

**IVAN BRENO LIMA DA SILVA**

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO AUTÓCTONE PARA O  
PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Pterophyllum scalare***

**BRAGANÇA - PA  
2022**

**IVAN BRENO LIMA DA SILVA**

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO AUTÓCTONE PARA O  
PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Pterophyllum scalare***

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado para obtenção do grau de licenciado no Curso de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, UFPA.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Dioniso de Souza Sampaio

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Natalino da Costa Sousa

**BRAGANÇA - PA  
2022**

**IVAN BRENO LIMA DA SILVA**

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO AUTÓCTONE PARA O  
PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Pterophyllum scalare***

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado  
para obtenção do grau de licenciado no Curso de  
Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará,  
UFPA.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Dioniso de Souza Sampaio

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Natalino da Costa Sousa

Data da defesa. Bragança – Pará: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Dioniso de Souza Sampaio  
Universidade Federal do Pará – Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Valéria S. do Couto  
Fundação Escola Bosque - Funbosque

---

Me. Thays Brito Reis Santos  
Universidade Tiradentes - UNIT

**BRAGANÇA - PA  
2022**

## DEDICATÓRIA

*A minha esposa Nayara dos Reis Silva, aos meus pais Dulcirene Alves Lima e Everaldo Oliveira. E aos meus filhos, Bernardo Silva Lima e Guilherme Silva Lima.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradecer primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter me proporcionado saúde em toda essa trajetória, pra que eu nunca desistisse desse meu objetivo, onde foi uma jornada árdua de vários obstáculos encontrados ao longo da minha jornada acadêmica e a realização deste trabalho.*

*Gratidão a minha esposa Nayara Reis pelo companheirismo em sempre me apoiar em toda essa caminhada, trajetória de muitos anos ao meu lado, desde o início de minha vida acadêmica em 2010 no curso de agronomia na UFAM, até hoje na conclusão da minha sonhada graduação no meu curso de ciências naturais. Aos meus filhos Bernardo e Guilherme pois é pra vocês que sempre vou procurar uma versão melhor de mim, pra proporciona-los uma boa educação e uma melhoria em todos os aspectos.*

*A meus pais Dulcirene e Everaldo por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem nos momentos mais difíceis, pela educação e apoio em toda minha vida, vocês dois são minha inspiração de todos dias. A minhas irmãs Bianca e Barbara, sei que posso contar a qualquer momento de minha vida.*

*Aos meus amigos de faculdade que nunca deixaram de me apoiar e me incentivaram a nunca desistir; Marcelo, Liandra, Cleydson, Thales, Rômulo, Taysa, Matheus, Laeny, Danilo, Jeferson, Oliven, com quem convivi todos esses anos na minha trajetória acadêmica, pelo companheirismo, e pela troca de experiências e pelo apoio em todos os momentos. Ao meu antigo comandante da polícia militar Major Luís Carlos, onde nunca me deu uma negativa, quando a liberação para realização de provas, aulas práticas de campo entre outros. Gratidão a tudo.*

*Estendo esse sentimento de gratidão aos professores, pelas correções e ensinamentos que me permitiram aprender um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.*

*Por fim, agradecer aos meus orientadores, Profº. Drº. Dioniso de Souza Sampaio e co-orientador Natalino Sousa, que conduziram meu trabalho com paciência e dedicação, sempre disponível a compartilhar os seus vastos conhecimentos.*

*“Grandes batalhas só são dadas a grandes guerreiros, faça do SENHOR a tua força e nenhum mal poderá te destruir (Pastora Patrícia)”*

## RESUMO

O uso de *Enterococcus faecium* em dietas para acará bandeira (*Pterophyllum scalare*) vem demonstrando resultados promissores, contudo, ainda faltam informações sobre o desempenho zootécnico e sistema imune em juvenis dessa espécie. Logo, este estudo objetivou avaliar o desempenho produtivo e o sistema imunológicos dos juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas suplementadas com probiótico *E. faecium*. Para tanto, foi realizado um delineamento com quatro tratamentos (C-controle, T1- dieta suplementada com *E. faecium*  $2,1 \times 10^4$ ; T2-  $2,1 \times 10^6$  e T3-  $2,1 \times 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> ração) com três repetições com duração de 90 dias. A cada 30 dias, foram realizadas biometrias para avaliação do desempenho produtivo, e ao final do experimento, análises de leucograma e capacidade fagocítica. Houve aumento no ganho de peso, taxa de crescimento específico e menor conversão alimentar dos juvenis de *P. scalare* dos tratamentos 2 e 3, com aumento do número de trombócitos, neutrófilos e monócitos, além da capacidade fagocítica. Portanto, a suplementação com *E. faecium* na concentração de  $2,1 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> para os juvenis de *P. scalare* promoveu desempenho de crescimento, e melhora do sistema imunológico.

**Palavras-chave:** Peixe ornamental, crescimento, sistema imunológico

## ABSTRACT

The use of *Enterococcus faecium* in diets for angelfish (*Pterophyllum scalare*) has shown promising results, however, there is still a lack of information on the zootechnical performance and immune system in juveniles of this species. Therefore, this study aimed to evaluate the productive performance and the immune system of *P. scalare* juveniles fed diets supplemented with the probiotic *E. faecium*. A design with four treatments was carried out (C-control, T1- diet supplemented with *E. faecium*  $2.1 \times 10^4$ ; T2-  $2.1 \times 10^6$  and T3-  $2.1 \times 10^8$  CFU.g<sup>-1</sup> feed) with three replications lasting 90 days. Every 30 days, biometrics were performed to evaluate the productive performance, and at the end of the experiment, analysis of leukogram and phagocytic capacity. There was an increase in weight gain, specific growth rate and lower feed conversion of *P. scalare* juveniles from treatments 2 and 3, with an increase in the number of thrombocytes, neutrophils and monocytes, in addition to the phagocytic capacity. Therefore, supplementation with *E. faecium* at a concentration of  $2.1 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> for *P. scalare* juveniles promoted growth performance and improved the immune system.

**Keywords:** Ornamental fish, growth, immune system

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos.....	11
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
3.1 Produção de peixes ornamentais.....	12
3.2 Probiótico.....	13
3.3 Mecanismo de ação.....	14
3.4 Tipos de probióticos.....	15
3.5 Acará bandeira ( <i>Pterophyllum scalare</i> ).....	17
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPITULO 1: Artigo.....</b>	<b>25</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de peixes ornamentais movimenta aproximadamente uma receita de US\$ 15 bilhões de dólares por ano, tornando uma atividade lucrativa em todos os segmentos da cadeia (base: pesca e aquicultura; atravessadores: exportadoras e lojas) até chegar ao consumidor final (KING, 2019; MSUKWA et al., 2021; MSUKWA et al., 2022). Atualmente, não há informações exatas sobre a quantidade e a receita gerada pela comercialização de peixes ornamentais, atividade realizada em mais de 125 países, contudo, são comercializados mais de 1 bilhão de espécimes distribuídos em 5300 espécies, que em 2017 gerou uma receita aproximadamente de US\$ 320 milhões (FAO, 2017; EVERS et al., 2019; MSUKWA et al., 2022).

Neste cenário promissor, o Brasil é conhecido como um dos principais exportadores de peixes ornamentais, expondo neste mercado espécies com formatos, cores e tamanhos diversificados que são oriundos do extrativismo, principalmente da bacia amazônica (TRIBUZY-NETO et al., 2021). As exportações desses animais geraram uma receita de aproximadamente US\$ 23 milhões, deste montante os Estado do Pará e Amazônia contribuem com 60% da produção nacional (ARAÚJO et al., 2020; TRIBUZY-NETO et al., 2021).

A procura por peixes ornamentais vem aumentando a cada ano, e para atender aos consumidores que estão cada vez mais exigentes, a piscicultura ornamental vem se intensificando com intuito de aumentar a densidade e a diversidade de espécies (ABE et al., 2019). Porém, atualmente, as doenças tornaram-se um dos principais problemas para o sucesso da criação, causando surtos de mortalidade e prejuízo econômico ao setor (DELALAY et al., 2019; HOSSAIN e Heo, 2021).

Na piscicultura ornamental, o primeiro sinal de peixes infectados por enfermidades patogênicas, com característica de doença, é comumente utilizado antibióticos (exemplo: oxitetracilina, eritromicina e enrofloxacina) para tratamento ou até mesmo como medidas preventivas (PREENA et al., 2019). Porém, o uso de concentrações inadequadas e o descarte dos resíduos de forma inapropriadas, geraram uma preocupação na saúde do manipulador, com meio ambiente e ainda possibilita a seleção de genes de resistência das cepas bacterianas patogênicas (HAMED et al., 2018; NARENDRAKUMAR et al., 2022). Além de apresenta baixa eficácia nos tratamentos e causar alterações histopatológicas no tecido dos peixes (Kim et al., 2019).

Desta forma estratégias visando o desenvolvimento da piscicultura ornamental sustentável é de fundamental importância para a indústria, logo, o uso de probióticos,

conhecidos como microrganismos que são ofertados nas dietas proporcionando efeitos benéficos ao hospedeiro, tem demonstrados resultados promissores para o crescimento, sistema imunológico, sobrevivência e resistência as infecções de bactérias patogênicas nos peixes ornamentais, como observado em *Poecilia latipinna* (AHMADIFARD et al., 2019), *Pterophyllum scalare* (DIAS et al., 2019), *Danio rerio* (MOHAMMADI et al., 2019), *Xiphophorus helleri* (RAJAN e Brindha, 2022) e *Carassius auratus* (HARIDAS et al., 2022).

O acará bandeira (*P. scalare*) é uma espécie nativa da região Amazônica de grande interesse na indústria de peixes ornamentais, devido ao seu formato e cores diversificadas (PANDOLFI et al., 2021; TRIBUZY-NETO et al., 2021), com estas características a espécie tem alto valor de mercado. Na piscicultura ornamental, este peixe adapta-se aos diversos sistemas de criação, tem rápido crescimento, fácil manejo reprodutivo, rusticidade ao manejo diário e comportamento pacífico nos viveiros (BEYGI et al., 2018; UENO-FUKURA et al., 2020; RIBEIRO et al., 2021). Apesar das características atrativas e viabilidade econômica na criação desta espécie (MANOEL e NAVARRO, 2018), ainda há lacunas sobre a sanidade e estratégias no seu desenvolvimento. Logo, o uso de probiótico torna-se uma possibilidade viável para minimizar os problemas decorrente com doenças, refletindo na saúde do animal e no seu crescimento, disponibilizando ao mercado exemplares com qualidade e competitivos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito da suplementação dietética com probiótico autóctone *Enterococcus faecium* para os juvenis de *P. scalare*.

### **2.2 Específicos**

- Determinar a concentração de bactérias heterotróficas totais e ácido láticas no intestino dos juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas sem e contendo *E. faecium*;
- Avaliar o desempenho de crescimento e sobrevivência dos juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas sem e contendo *E. faecium*;
- Contabilizar as células de leucócitos e trombócitos dos juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas sem e contendo *E. faecium*;

- Determinar a atividade fagocítica dos juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas sem e contendo *E. faecium*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Produção de peixes ornamentais

A indústria de peixes ornamentais movimenta uma receita de aproximadamente US\$ 15 bilhões, com a comercialização de equipamentos, rações, produtos, sistemas e os peixes ornamentais. A crescente expansão desta atividade entre os países, sendo praticada em aproximadamente 125 países, é devido a demanda crescente de consumidores. Assim, a piscicultura ornamental vem se intensificando com uso de tecnologias (bombas, alimentadores automáticos entre outros), estratégias para aumentar a produção e até mesmo iniciando a criação de novas espécies (ABE et al., 2019; EVERS et al., 2019; REIS et al., 2021). Neste cenário, a piscicultura contribui com 90% das espécies destinado ao segmento da aquariofilia, mostrando-se uma atividade atrativa e economicamente rentável, sendo comercializado mais de um milhão de exemplares distribuídos em aproximadamente 5300 espécies, movimentando no ano de 2016 uma receita de US\$ 347 milhões em exportações e US\$ 287 milhões em importações (FAO, 2017; EVERS et al., 2019; TRIBUZY-NETO et al., 2021).

O Brasil, neste cenário, é reconhecido como um dos principais fornecedores de espécies ornamentais de água doce da América do Sul, principalmente, oriundos da região amazônica (EVERS et al., 2019; ABE et al., 2019), devido à variedade de espécies com formatos diferenciados e padrões de cores diversos (ABE et al., 2019; FERREIRA et al., 2020). Logo, o país ocupa a 8ª posição no ranking da exportação, sendo estimado a comercialização de mais 142,2 milhões de exemplares entre os anos de 2006 a 2015, principalmente para União Europeia, Cingapura, Hong Kong, Japão, Estados Unidos e China, arrecadando uma receita estimada em US\$ 23 milhões (EVERS et al., 2019; TRIBUZY-NETO et al., 2021).

O aquarismo tornou-se um hobby popular e atrai milhares de pessoas por ano, sendo observado maior frequência de aquários em apartamentos, casas e pontos comerciais, pois além de decorar o ambiente, os cuidados aplicados a manutenção dos peixes ornamentais proporcionam uma sensação de tranquilidade e bem-estar ao cuidador (FARIA et al., 2019). Logo, a aquariofilia faz parte do segmento pet, e somente no ano de 2019, o Brasil, apresentou uma população de 19,4 milhões de animais, ocupando o quarto lugar no ranking

mundial na aquisição de peixes ornamentais, ficando atrás apenas dos EUA, China e Reino Unido (ABINPET, 2020).

Contudo, a indústria de peixes ornamentais está cada vez mais exigente, procurando qualidade, beleza e novas espécies. Nessa indústria, os peixes amazônicos são muito apreciados, e para atender este mercado a piscicultura ornamental vem se intensificando, aumentar a produção, e se aliando a pesquisas para os protocolos de criação de novas espécies, que a priori, são oriundas principalmente da pesca (ABE et al., 2019; REIS et al., 2020). Logo, as pesquisas com foco na sanidade, nutrição, crescimento e resistência, são fatores essenciais para alavancar a piscicultura de peixes ornamentais amazônicos de forma sustentável, disponibilizando espécies com qualidade para o mercado nacional e internacional.

### 3.2 Probiótico

A palavra probióticos é oriunda da junção entre os termos latino “pro” e grega “bios” que significa para a vida (ZIVKOVIC, 1999). Inicialmente foi proposto por Metchnikoff em 1908, ao observar a longevidade proporcionada pela ingestão de bactérias ácido láticas (BAL) em humanos. Em 1965 Lilly e Stillwell, caracterizaram os probióticos como substâncias secretadas por microrganismos que estimulam o crescimento de outro. Posteriormente, Fuller (1989), caracterizou os probióticos, como microrganismos vivos suplementado a dieta, capazes de modular a microbiota intestinal do hospedeiro, conferindo-lhes efeitos benéficos à saúde.

O conceito deste termo foi sendo moldado, tendo em vista, os métodos de administração dos probióticos bem como a influência da dinâmica do ambiente aquático na composição da microbiota intestinal dos hospedeiros. Gatesoupe (1999), definiu probióticos, como microrganismos vivos que colonizam o trato gastrointestinal e mantem-se em concentrações viáveis, proporcionando aumento no desempenho produtivo e principalmente a melhora no sistema imunológico do hospedeiro. Verschuere et al. (2000), conceituaram o termo probióticos como microrganismos vivos capazes de promover efeitos benéficos ao hospedeiro via suplementação alimentar, sinalizando dessa forma, o emprego mais abrangente da palavra probióticos na aquicultura.

Atualmente, o uso de probiótico em peixes vem sendo utilizado como estratégia para a criação, com resultados promissores para os peixes, sendo observado como efeito benéfico a modulação da microbiota intestinal, melhora do sistema imunológico, resistência a doenças, aumento da vilosidade intestinal e de enzimas digestivas,

proporcionando o aumento no crescimento dos animais e sobrevivência, refletido em maior produtividade (SOUSA et al., 2019; DIAS et al., 2019).

Desta forma, o uso destes microrganismos em dietas para os peixes ornamentas durante os ciclos de criação vem ganhado cada vez mais espaço na piscicultura, sendo atualmente incorporado nas rações para serem ofertadas aos animais, resultando na diminuição da mortalidade com aumento da produtividade, além de espécie com qualidade e competitivas para a indústria de peixes ornamentais.

### 3.3 Mecanismo de ação

A microbiota intestinal desempenha um papel importante em diversos processos regulatórios, logo, a quantidade e a diversidade microbiana presente no trato gastrointestinal influenciam diretamente nos processos fisiológicos do organismo (LAZADO e CAINPANG, 2014; BUTT e VOLKOFF, 2019). A composição de bactérias consideradas benéficas no intestino, pode promover a competição por sítios de ligação no epitélio intestinal e nutrientes, favorecendo dessa forma, a diminuição e/ou exclusão de bactérias com potencial patogênico, além disso, a secreção de substâncias químicas, dentre outros metabólitos interage com as células absortivas no intestino auxiliando no processo digestivo, assim como, no estímulo de produção e liberação de hormônios e outros peptídeos que atuam no sistema imunológico melhorando a resposta imune do hospedeiro (BUTT e VOLKOFF, 2019).

Desta forma, é importante que as bactérias probióticas sejam incorporadas na dieta dos animais em concentrações ideais e diariamente, pois a ação dessas bactérias depende de suas características e sua inter-relação com o hospedeiro. Os efeitos benéficos ocorrem com a capacidade de colonização das bactérias no intestino do animal, sendo diretamente relacionada com a resistência fisiológica do hospedeiro (BALCÁZAR et al., 2006; CAIPANG e LAZADO, 2015).

A colonização é uma das fases mais importante para considerar uma bactéria com características probióticas, e assim promove a modulação da microbiota intestinal, no qual ocorre por meio da competição por nutrientes e/ou sítios de ligação (BORRELLI et al., 2016), produção de bacteriocinas, peróxidos e ácidos orgânicos (VERSCHUERE et al., 2000; ZHANG et al., 2020). Estes efeitos moduladores da adição de probióticos a dieta, foram observados no peixe barbo-rosado (*Puntius conchonius*) (PARVATHI et al., 2012), peixe-zebra (*Danio rerio*) (ARANI et al., 2021), peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) (PAIXÃO et al., 2020) e acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) (SOUSA et al., 2020).

O estímulo na produção de enzimas digestivas, auxilia na digestão e melhor absorção de nutrientes (HOSEINIFAR et al., 2017; ARANI et al., 2019), conferindo melhor desempenho de crescimento, tais como, ganho de peso, crescimento e conversão alimentar (DIAS et al., 2019; HIRE et al., 2020). Arani et al. (2019), avaliaram o efeito de *Pediococcus acidilactici* na suplementação dietética do peixe-zebra (*D. rerio*) e observaram o aumento da atividade enzimática da lisozima no muco e melhora no desempenho produtivo. Sarojini et al. (2020), reportaram que a inclusão do probiótico *Bacillus subtilis* V1 produtor de bacteriocina, na dieta do peixe-dourado (*Carassius auratus*), que favoreceu o aumento na atividade das enzimas amilase, protease e lipase, proporcionando melhor desempenho no crescimento, confirmando assim a influência da microbiota na nutrição animal.

A capacidade imunomoduladora das bactérias probióticas é um mecanismo de grande relevância para os hospedeiros, sendo um dos principais aspectos desejados para a piscicultura ornamental (DIAS et al., 2019). O aumento da higidez, devido a atividade fagocítica proporcionado pelo incremento no número de neutrófilo, monócito e trombócito, potencializando as respostas imunológicas (LAZADO e CAIPANG, 2014; PAIXÃO et al., 2020). Estes efeitos benéficos ao sistema imunológico é um dos pontos chaves para o sucesso da criação, proporcionando o bem-estar aos animais, e com isso o crescimento, a qualidade e a exuberância dessas espécies a serem ofertadas ao mercado de peixes ornamentais.

### 3.4 Tipos de probióticos

Os principais grupos de bactérias probióticas utilizadas em peixes, são as ácido lácticas (BAL) e bacillus, representados pelos gêneros *Enterococcus* (DIAS et al., 2019; SOUSA et al., 2019), *Lactobacillus* (PAIXÃO et al., 2020), *Lactococcus* (SUN et al., 2018), *Leuconostoc* (ALLAMEH et al., 2017; SELIM et al., 2019), *Pediococcus* (AHMADIFAR et al., 2020; ARANI et al., 2021), *Weissela* (JAHANGIRI et al., 2018) e *Bacillus* (DIAS et al., 2019).

As bactérias ácido lácticas (BAL), são microrganismos heterogêneos, microaerófilos, não móveis, gram positivas, catalase negativa, não formadores de esporos, produtores de ácido láctico como produto final de fermentação de carboidratos, podem apresentar forma de bacilos e/ou cocos. O interesse na utilização de bactérias ácido lácticas se deve aos efeitos proporcionados ao hospedeiro, tais efeitos incluem a capacidade em modular a microbiota gastrointestinal e produzir substâncias antimicrobianas exercendo

assim, papel imunoestimulante e antagônico frente aos patógenos (HOSEINIFAR et al., 2018; RINGO et al., 2020).

O grupo *Bacillus* com potencial probiótico, pertence à ordem Bacillales, são microrganismos quimiorganotróficos, móveis quando apresentam flagelos e não móveis, são gram positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, possuem forma de bastonetes retos ou levemente curvados com ocorrência individual, ou em pares, podendo formar cadeias ou filamentos longos, além de produzir endósporos (ROSA et al., 2022).

Na piscicultura ornamental, a inclusão de probióticos a dieta de peixes, tem demonstrado efeitos satisfatórios, melhorando a performance do sistema imunológico inespecífico e não específico, além da resistência a infecções de origem bacteriana e melhor absorção de nutrientes, resultando também no crescimento dos peixes (YAMASHITA et al., 2017; GOBI et al., 2018; ADORIAN et al., 2019; GOPINATH et al., 2019).

Diante disso, pesquisas são desenvolvidas neste campo para avaliar os efeitos benéficos de probióticos em peixes ornamentais, efeitos de crescimento foram observados nas espécies ornamentais *Pterophyllum scalare* (DIAS et al., 2019; SOUSA et al., 2020) e *Osphronemus goramy* (ILLANJAM et al., 2019), inibição bactericida e/ou bacteriostática de patógenos em foram observados em *Carassius auratus* (VADASSERY e PILLAI, 2020), além da produção de substâncias extracelulares que estimulam células do sistema imune, relatado em *Danio rerio* (ARANI et al., 2019) e *Amphiprion ocellaris* (PAIXÃO et al., 2020).

Outros relatos, observa-se que a administração de *Pediococcus acidilactici* por sua vez, fortaleceu a imunidade e melhorou os índices de crescimento em *Danio rerio* (ARANI et al., 2021). Efeitos benéficos da formulação dietética contendo *Enterococcus faecium* foram observados nas espécies *Pterophyllum scalare*, constatando-se melhor desempenho de crescimento e sobrevivência (DIAS et al., 2019). A suplementação com *Lactobacillus plantarum* proporcionou o aumento das vilosidades intestinais e melhor performance no desempenho produtivo em *Amphiprion ocellaris* (PAIXÃO et al., 2020).

Além da suplementação do probiótico na ração, observa-se também efeitos benéficos com o bioencapsulamento de probiótico em alimento vivo, como relatado por Hire et al. (2020), que observaram que o enriquecimento de artêmia com *Bacillus* spp. proporcionou o aumento no desempenho de crescimento de larvas de *Carassius auratus*. Em um estudo realizado com larvas de *Amatitlania nigrofasciata* alimentados com dieta contendo *Lacticaseibacillus casei* observou-se melhor desempenho de crescimento,

aumento da atividade de enzimas digestivas como protease, amilase e lipase, assim como, aumento na atividade de lisozima (MOHAMMADIAZARM e MANIAT, 2021).

O uso de probiótico nos peixes, tornou-se uma estratégia eficaz na prevenção de doenças, oriundo dos seus efeitos benéficos, que além da melhoria no sistema imunológico, refletindo na saúde dos animais, há aumento no crescimento, proporcionando menor tempo para a comercialização dos peixes ornamentais, que são comercializados pelo tamanho na fase de juvenil.

### 3.5 Acará bandeira (*Pterophyllum scalare*)

O gênero *Pterophyllum* significa “em forma de folha”, este gênero é composto por três espécies *P. altum*, *P. leopoldi* e *P. scalare*, (Cacho, 1999). Dentre as espécies de peixes ornamentais, o acará-bandeira (*P. scalare*), é oriundo da bacia Amazônica, que por ser um dos mais belos peixes ornamentais e com cores intensas possibilitou a sua popularidade mundialmente, sendo comercializados nacionalmente e internacionalmente (RIBEIRO et al., 2008).

Esta espécie pertence à grande família dos ciclídeos, e seu principal diferencial é a apresentação da linha lateral interrompida (Lima, 2003). Apresenta o corpo comprimido lateralmente, forma triangular, criada por suas nadadeiras dorsal e anal que são fortes e alongadas. A variedade selvagem apresenta corpo prateado, que contrasta com listras verticais pretas e nadadeiras ventrais modificadas, finas e longas, além de apresentar parte do olho vermelho (RIBEIRO et al., 2021).

Exemplares de acará-bandeira são considerados reprodutivos quando atingem 8 cm de comprimento total (RIBEIRO et al., 2021) ou 8 a 10 gramas (CACHO, 1999). Devido à seleção genética e ao processo de domesticação da espécie, diversas variedades são encontradas no mercado, existindo oito principais variedades: ouro, marmorato, selvagem, siamês, negro, fumaça, palhaço e albino (BEYGI et al., 2018; RIBEIRO et al., 2021).

Os criadores comerciais desta espécie estão concentrados no sul e sudeste do Brasil, localizados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná. É uma espécie que se adapta a diversos ambientes e sistemas de produção e tem boa aceitabilidade de alimento inerte (PEREIRA et al., 2016; MANOEL e NAVARRO, 2018), o que levou ao seu desenvolvimento no cultivo, sendo alvo de estudos de densidade, nutrição e sanidade (RIBEIRO et al., 2008; PEREIRA et al., 2016).

Um dos primeiros relatos sobre o uso de probiótico para o *P. scalare* foi realizado por Dias et al. (2019), que avaliaram o crescimento e sobrevivência desses animais na fase

inicial de juvenil com dietas contendo *Enterococcus faecium*. Já Sousa et al. (2020), observaram maior crescimento das larvas com artêmia bioencapsulada com probiótico comercial. Contudo, ainda há lacunas a serem sanadas sobre o crescimento, na fase de juvenil apto para a comercialização, assim como os efeitos para o sistema imunológico, uma vez que não há relatos sobre melhoria com dietas contendo probiótico.

#### 4 REFERÊNCIAS

Abe, H. A., Dias, J. A. R., Sousa, N. D. C., Couto, M. V. S. D., Reis, R. G. A., Paixão, P. E. G., & Fujimoto, R. Y. (2019). Growth of Amazon ornamental fish *Nannostomus beckfordi* larvae (Steindachner, 1876) submitted to different stocking densities and feeding management in captivity conditions. *Aquaculture Research*, *50*, 2276-2280.

ABINPET. Mercado pet Brasil. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**, São Paulo, 2020. Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em: 08 jun. 2022.

Adorian, T. J., Jamali, H., Farsani, H. G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., & Roozbehfar, R. (2019). Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and antimicrobial proteins*, *11*, 248-255.

Ahmadifar, E., Sadegh, T. H., Dawood, M. A., Dadar, M., & Sheikhzadeh, N. (2020). The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, *516*, 734656.

Ahmadifard, N., Rezaei Aminloo, V., Tukmechi, A., & Agh, N. (2019). Evaluation of the impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on growth performance, reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental fish *Poecilia latipinna*. *Probiotics and antimicrobial Proteins*, *11*, 957-965.

Allameh, S. K., Noaman, V., & Nahavandi, R. (2017). Effects of probiotic bacteria on fish performance. *Advanced Techniques in Clinical Microbiology*, *1*(2), 11.

Arani, M., Safari, O., Allame, S. K., Asadollah Nasrabadi, S., Mohammadi, M. J., Ashouri, G., & Ganjoo, M. S. (2021). Effect evaluation of *Pediococcus acidilactici* (Bactocell) as a probiotic dietary supplementation, on growth performance, intestine microbiota and skin mucus bactericidal response in zebra fish (*Danio rerio*). *Journal of Ornamental Aquatics*, *8*, 15-25.

- Arani, M., Salati, A. P., Safari, O., & Keyvanshokooh, S. (2019). Dietary supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Nutrition*, 25(4), 854-861.
- ARAÚJO, J. G., dos SANTOS, M. A. S., Rebello, F. K., & Isaac, V. J. (2017). Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43, 297-307.
- Balcázar, J., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., & Ruiz-Zarzuola, I. (2006). Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18, 65-70.
- Beygi, M., Paknejad, H., & Sanchuli, H. (2018). Effects of dry, fat, live, and combined diets on improving breeding productive performance and livestock survival of angel fish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture Sciences*, 6, 74-82.
- Borrelli, L., Aceto, S., Agnisola, C., De Paolo, S., Dipineto, L., Stilling, R. M., & Fioretti, A. (2016). Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. *Scientific reports*, 6, 1-9.
- Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in endocrinology*, 10, 9.
- Cacho, M. D. S. R., Yamamoto, M. E., & Chellappa, S. (1999). Comportamento reprodutivo do acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Cuvier & Valenciennes (Osteichthyes, Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 16, 653-664.
- Caipang, C. M. A., & Lazado, C. C. (2015). Nutritional impacts on fish mucosa: immunostimulants, pre-and probiotics. In *Mucosal health in aquaculture* (pp. 211-272). Academic Press.
- Delalay, G., Berezowski, J. A., Diserens, N., & Schmidt-Posthaus, H. (2019). Characteristics of bacterial isolates in Swiss farmed and ornamental fish from a retrospective study from 2000 to 2017. *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*, 161, 43-57.
- Dias, J. A. R., Abe, H. A., Sousa, N. C., Silva, R. D. F., Cordeiro, C. A. M., Gomes, G. F. E., & Fujimoto, R. Y. (2019). *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquaculture international*, 27, 463-474.
- Dias, J. A. R., Abe, H. A., Sousa, N. C., Silva, R. D. F., Cordeiro, C. A. M., Gomes, G. F. E., & Fujimoto, R. Y. (2019). *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental

neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquaculture international*, 27, 463-474.

Evers, H. G., Pinnegar, J. K., & Taylor, M. I. (2019). Where are they all from?—sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. *Journal of Fish Biology*, 94, 909-916.

FAO - **Aquaculture Newsletter**. (2017). Overview of ornamental species aquaculture. 56, 39p.

Faria, C. F. A., Pontes, C. S., Ribeiro, K., & de Faria, P. M. C. (2019). Caracterização do mercado de aquicultura ornamental e aquarofilia no Rio Grande do Norte. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, 8, 203-215.

Ferreira, V. A. M., Rodrigues, T. T. E., Silva, P. G., Freitas, C. E. C., & Yamamoto, K. C. (2020). Avaliação do comércio de peixes ornamentais no Estado do Amazonas-Brasil. *Observatorio Econ Latinoam*, 2, 1-21.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66, 365-378.

Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.

Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J. C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M., & Iswarya, A. (2018). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*, 74, 501-508.

Gopinath, J., Ramanibai, R., Krishnakumar, V., & Inbasekaran, S. (2019). Studies on Biochemical Parameters of Probiotic Supplemented Diet on Rohu (*Labeo rohita*) Fresh Water Fish Fingerlings. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 7, 172.

Hamed, S. B., Ranzani-Paiva, M. J. T., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Ishikawa, C. M., & Esteban, M. A. (2018). Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 550-562.

Haridas, D. V., Joshy, C. G., & Pillai, D. (2022). Optimization of the multispecies probiotic combination with N-acylhomoserine lactone-degrading ability for increased disease resistance of *Carassius auratus* using response surface methodology. *Aquaculture*, 548, 737597.

Hire, J. K., Wasave, S. S., Pai, R., Meshram, S. J., Ghode, G. S., Sawant, S. S., & Wasave, S. M. (2020). effect of probiotic, bacillus spp. enriched artemia on growth of gold fish,

carassius auratus (linnaeus, 1758) larvae. *Journal of Experimental Zoology, India*, 23(Suppl. 1), 741-745.

Hoseinifar, S. H., Dadar, M., & Ringø, E. (2017). Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario. *Aquaculture Research*, 48, 3987-4000.

Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 9, 2429.

Hossain, S., & Heo, G. J. (2021). Ornamental fish: a potential source of pathogenic and multidrug-resistant motile *Aeromonas* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 72, 2-12.

Illanjiam, S., Sivakumar, J., Sundaram, C. S., & Rao, U. S. (2019). Comparative study of Probiotic Bacteria on ornamental fish giant gourami, *Osphronemus goramy* for its survival and growth. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12, 262-268.

Jahangiri, L., Ashayerizadeh, O., Kolangi, H., & Tabarraei, A. (2018). Isolation of probiotic bacteria from guppy *Poeciliareticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(6), 809-815.

Kim, A., Kim, N., Roh, H. J., Chun, W. K., Ho, D. T., Lee, Y., & Kim, D. H. (2019). Administration of antibiotics can cause dysbiosis in fish gut. *Aquaculture*, 512, 734330.

King, T. A. (2019). Wild caught ornamental fish: A perspective from the UK ornamental aquatic industry on the sustainability of aquatic organisms and livelihoods. *Journal of Fish Biology*, 94, 925-936.

Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, 39, 78-89.

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

Manoel, V. T., & Navarro, R. D. (2018). Economic And Logistical Viability of Production of Freshwater Angelfish (*Pterophyllum Scalare*). *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 22(1) 56-61.

Mohammadi Arani, M., Salati, A. P., Safari, O., & Keyvanshokoo, S. (2019). Dietary supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Nutrition*, 25, 854-861.

Mohammadiazarm, H., & Maniat, M. (2021). Lacticaseibacillus casei in diet of juvenile convict cichlid fish (*Amatitlania nigrofasciata*): Evaluating growth performance, digestive

enzyme activities, immune responses, and stress resistance. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 647-654.

Msukwa, A. V., Cowx, I. G., & Harvey, J. P. (2021). Vulnerability assessment of Lake Malawi's ornamental fish resources to export ornamental trade. *Fisheries Research*, 238, 105869.

Msukwa, A. V., Cowx, I. G., & Harvey, J. P. (2022). Ornamental fish export trade in Malawi. *Journal of Fish Biology*, 100, 300-314.

Narendrakumar, L., Sudhagar, A., Preena, P. G., Nithianantham, S. R., Mohandas, S. P., & Swaminathan, T. R. (2022). Detection of *Mycobacterium marinum* and multidrug-resistant bacteria in a chronic progressive disease outbreak among Siamese fighting fish (*Betta splendens*) in India. *Biologia*, (online), 1-9.

Paixão, P. E. G., do Couto, M. V. S., da Costa Sousa, N., Abe, H. A., Reis, R. G. A., Dias, J. A. R., & Fujimoto, R. Y. (2020). Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, 526, 735395.

Pandolfi, V. C. F., Yamachita, A. L., de Souza, F. P., de Godoy, S. M., de Lima, E. C. S., Feliciano, D. C., & Lopera-Barrero, N. M. (2021). Development of microsatellite markers and evaluation of genetic diversity of the Amazonian ornamental fish *Pterophyllum scalare*. *Aquaculture International*, 29, 2435-2449.

Pereira, S. L., Gonçalves Junior, L. P., Azevedo, R. V. D., Matiello, M. D., Selvatici, P. D. C., Amorim, I. R., & Mendonça, P. P. (2016). Diferentes estratégias alimentares na larvicultura do acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, Cichlidae). *Acta Amazonica*, 46, 91-98.

Preena, P. G., Dharmaratnam, A., Raj, N. S., Kumar, T. V. A., Raja, S. A., & Swaminathan, T. R. (2019). Antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolated from freshwater ornamental fish, guppy showing bacterial disease. *Biologia*, 74(8), 1055-1062.

Rajan, M. R., & Brindha, G. (2022). Evaluation of dissimilar intestinal bacteria incorporated feeds on growth of ornamental fish Swordtail *Xiphophorus helleri*. *Letters in Applied Microbiology*. (versão online).

Reis, R. G. A., Alves, P. C. J., Abe, H. A., da Costa Sousa, N., Paixão, P. E. G., Palheta, G. D. A., ... & Takata, R. (2021). Feed management and stocking density for larviculture of the Amazon ornamental fish L333 king tiger pleco *Hypancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae). *Aquaculture Research*, 52(5), 1995-2003.

Ribeiro, M. W. S., Oliveira, A. T., & Carvalho, T. B. (2021). Water temperature modulates social behavior of ornamental cichlid (*Pterophyllum scalare*) in an artificial system. *Journal of Applied Aquaculture*, 1-13.

Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 129(1), 116-136.

Rosa, C. E., Pinilla, C. M. B., Stincone, P., Pereira, J. Q., Varela, A. P. M., Mayer, F. Q., & Brandelli, A. (2022). Genomic characterization and production of antimicrobial lipopeptides by *Bacillus velezensis* P45 growing on feather by-products. *Journal of Applied Microbiology*, 132, 2067-2079.

Sarojini, K., Ajitha, S. S., Ramasubburayan, R., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2020). Studies on the adhesion, aggregative properties and the probiotic efficiency of a potent bacteriocin-producing shrimp gut isolate *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* V1 against *Carassius auratus*. *Aquaculture International*, 28, 1639-1656.

Selim, K. M., El-Sayed, H. M., El-Hady, M. A., & Reda, R. M. (2019). In vitro evaluation of the probiotic candidates isolated from the gut of *Clarias gariepinus* with special reference to the in vivo assessment of live and heat-inactivated *Leuconostoc mesenteroides* and *Edwardsiella* sp. *Aquaculture International*, 27, 33-51.

Sousa, N., do Couto, M. V. S., Abe, H. A., Paixão, P. E. G., Cordeiro, C. A. M., Monteiro Lopes, E., & Fujimoto, R. Y. (2019). Effects of an *Enterococcus faecium*-based probiotic on growth performance and health of Pirarucu, *Arapaima gigas*. *Aquaculture Research*, 50(12), 3720-3728.

Sousa, N., do Couto, M. V. S., Paixão, P. E. G., dos Santos Medeiros, E., de Souza, J. C. N., Barros, F. A. L., & Cordeiro, C. A. M. (2020). Enriched *Artemia* Nauplii with Commercial Probiotic in the Larviculture of Angelfish *Pterophyllum scalare* Lichtenstein (1823). *Journal of Fisheries Science*, 2, 17-21.

Sun, Y., He, M., Cao, Z., Xie, Z., Liu, C., Wang, S., & Zhou, Y. (2018). Effects of dietary administration of *Lactococcus lactis* HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Fish & shellfish immunology*, 82, 296-303.

Tribuzy-Neto, I. A., Beltrao, H., Benzaken, Z. S., & Yamamoto, K. C. (2021). Analysis of the ornamental fish exports from the Amazon State, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 46, 1-9.

- Ueno-Fukura, M., Aya-Baquero, E., & Collazos-Lasso, L. F. (2020). Biofloc application in larviculture of *Pterophyllum scalare* at different stocking densities. *AAFL Bioflux*, *13*, 3028.
- Vadassery, D. H., & Pillai, D. (2020). Quorum quenching potential of *Enterococcus faecium* QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(3), 1333-1343.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, *64*, 655-671.
- Yamashita, M. M., Pereira, S. A., Cardoso, L., De Araujo, A. P., Oda, C. E., Schmidt, É. C., & Mouriño, J. L. P. (2017). Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. *Aquaculture Nutrition*, *23*, 1235-1243.
- Zhang, H. P., Dong, W. L., Chen, L., Wang, Y. M., Muhammad, I., Ju, A. Q., & Kong, L. C. (2020). Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* C20015 on growth, immunity, and disease resistance in koi carp. *Aquaculture International*, *28*, 1797-1809.
- Zivković, R. (1999). Probiotics or microbes against microbes. *Acta medica Croatica: casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, *53*, 23-28.

## CAPITULO I

**Efeito do probiótico *Enterococcus faecium* no crescimento e higidez da bactéria  
probiótica no peixe ornamental amazônico *Pterophyllum scalare***

(ARTIGO FORMATADO NAS NORMAS DA AQUACULTURE RESEARCH)

1 Efeito do probiótico *Enterococcus faecium* no crescimento e higidez da bactéria  
2 probiótica no peixe ornamental amazônico *Pterophyllum scalare*

3  
4 Ivan Breno Lima da Silva<sup>1</sup>, Márcia Valéria Silva do Couto<sup>2</sup>, Dioniso de Souza Sampaio<sup>1</sup>,  
5 Natalino da Costa Sousa<sup>3\*</sup>

6  
7 <sup>1</sup> Universidade Federal do Pará, *Campus Bragança*, Bragança, PA, Brasil.

8 <sup>2</sup> Fundação Escola Bosque, Belém, PA, Brasil.

9 <sup>3</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, Aracaju, SE, Brasil. \*Autor  
10 correspondente: [natal.engpesca@gmail.com](mailto:natal.engpesca@gmail.com)

11  
12  
13 **Abstract**

14 The use of *Enterococcus faecium* in diets for angelfish (*Pterophyllum scalare*) has shown  
15 promising results, however, there is still a lack of information on the zootechnical  
16 performance and immune system in juveniles of this species. Therefore, this study aimed  
17 to evaluate the productive performance and the immune system of *P. scalare* juveniles fed  
18 diets supplemented with the probiotic *E. faecium*. A design with four treatments was  
19 carried out (C-control, T1- diet supplemented with *E. faecium*  $2.1 \times 10^4$ ; T2-  $2.1 \times 10^6$  and  
20 T3-  $2.1 \times 10^8$  CFU.g<sup>-1</sup> feed) with three replications lasting 90 days. Every 30 days,  
21 biometrics were performed to evaluate the productive performance, and at the end of the  
22 experiment, analysis of leukogram and phagocytic capacity. There was an increase in  
23 weight gain, specific growth rate and lower feed conversion of *P. scalare* juveniles from  
24 treatments 2 and 3, with an increase in the number of thrombocytes, neutrophils and  
25 monocytes, in addition to the phagocytic capacity. Therefore, supplementation with *E.*  
26 *faecium* at a concentration of  $2.1 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> for *P. scalare* juveniles promoted growth  
27 performance and improved the immune system.

28 **Keywords:** Ornamental fish, immune system, bacteria in feces, villi

29  
30  
31 **Introdução**

32 A indústria de peixes ornamentais tem crescido anualmente, gerando uma receita  
33 de US\$ 372 milhões em 2016, com a comercialização somente de peixes ornamentais  
34 (FAO, 2017). Dentre as espécies de interesse comercial no mercado nacional e  
35 internacional, destaca-se o acará bandeira (*Pterophyllum scalare*, Lichtenstein 1923),

36 devido sua cor, formato, fácil reprodução, manejo e adaptação aos sistemas de cultivo  
37 (Ribeiro et al., 2008; Takashi et al., 2010; Kouba et al., 2013; Fujimoto et al. 2016). Apesar  
38 do cenário favorável para esta espécie, ainda são observados problemas com doenças,  
39 principalmente as bacterianas, devido às más condições sanitárias proporcionado pelo  
40 confinamento (Walczak et al., 2017).

41 Desta forma, a buscar por estratégias alternativas com intuito de melhorar o sistema  
42 imunológico e substituir os tratamentos convencionais tornam-se essências para o  
43 desenvolvimento da piscicultura ornamental sustentável (Mouriño et al., 2017; Jatobá et  
44 al., 2018; Dias et al., 2019). Logo, o uso de bactérias probióticas autoctones em dietas para  
45 peixes vem demonstrando resultados promissores na modulação da microbiota intestinal,  
46 melhorando o sistema imunológico e aumentando a resistência do animal às bactérias  
47 patogênicas, refletindo na higidez do animal, possibilitando um aumento do desempenho  
48 produtivo dos peixes (Merrifield et al., 2010; Nandi et al., 2016; Linh et al., 2018; Jatobá et  
49 al., 2018; Dias et al., 2019). Em peixes ornamentais, há relatos do uso de dietas contendo  
50 bactérias ácido lácticas como o *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus* e *L.*  
51 *acidophilus* com resultados promissores para a higidez e desempenho produtivo  
52 (Hoseinifar et al., 2015; Ahire et al., 2018; Dias et al., 2019).

53 Na literatura, há relatos do uso de probiótico e seus efeitos benéficos para o  
54 crescimento em *P. scalare* na fase alevinos (Dias et al., 2019), contudo, não informações  
55 sobre os efeitos benéficos para sistema imunológico e o desempenho crescimento na fase  
56 juvenil, sendo necessário para validar o efeito promotor desta bactéria probiótica na criação  
57 desta espécie.

58 Diante do contexto, o presente estudo objetivou avaliar o desempenho produtivo e  
59 os parâmetros imunológicos juvenis de *P. scalare* alimentados com dieta suplementadas  
60 com probiótico *E. faecium*.

61

## 62 **Material e Métodos**

63 Cepas bacterianas e preparação da dieta

64 A bactéria probiótica *E. faecium* utilizada nas dietas foi isolada de juvenis de *P.*  
65 *scalare* saudáveis (Dias et al., 2019). A cepa foi cultivada e mantida em MRS (Man Rogoza  
66 Sharpe) na concentração de  $2,1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

67 Para a suplementação nas dietas, a cepa ativada foi diluída até as concentrações  
68 desejadas e aspergida na proporção de 100mL.kg<sup>-1</sup> de ração comercial (Proteína bruta  
69 32,5%, extrato etéreo 40%, fibra bruta 2,5%, Cinza 8,5%, cálcio 2,8% e fósforo 5,3%),

70 seguindo a metodologia de Jesus et al. (2016). Posteriormente, as dietas foram  
71 homogeneizadas em recipientes hermeticamente fechados e incubadas a 35°C em estufa  
72 com circulação de ar. Após 24 horas o recipiente foi aberto e mantido sobre secagem  
73 novamente por 24 horas no mesmo ambiente. As rações foram mantidas nas concentrações  
74 experimentais e refeitas a cada 7 dias de acordo com a metodologia de Dias et al. (2019).

75

#### 76 Delineamento experimental

77 O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da  
78 Embrapa (CEUA N° 03.13.09.015.00.00).

79 Foram utilizados 120 espécimes de juvenis saudáveis de *P. scalare* (comprimento  
80 padrão de 3,4±0,5 cm e peso de 1,68±0,4 g). Os peixes foram distribuídos em 12 aquários  
81 com capacidade de 90L em sistema de recirculação e aeração constante. O experimento foi  
82 realizado em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (C-  
83 controle, T1- dieta suplementada com *E. faecium* 2,1 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de ração, T2- dieta  
84 suplementada com *E. faecium* 2,1 x 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de ração e T-3 dieta suplementada com *E.*  
85 *faecium* 2,1 x 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup> ração), todos com três repetições.

86 O experimento teve duração de 90 dias, sendo as dietas experimentais fornecidas  
87 *ad libitum* com frequência de duas vezes ao dia (7:00 e 17:00 horas). Durante o período  
88 experimental os valores físicos e químicos da água mantiveram-se em: temperatura de  
89 28,6±0,28 °C, oxigênio dissolvido de 6,78±0,34 mg.L<sup>-1</sup>, pH de 7,62±0,30, condutividade  
90 elétrica de 368±32,12 µS.cm<sup>-1</sup> e amônia total de 0,13±0,11 mg.L<sup>-1</sup>.

91

#### 92 Parâmetros de crescimento

93 Durante o período experimental foram realizadas biometrias de todos os exemplares  
94 de cada repetição a cada 30 dias (0, 30, 60 e 90 dias) para determinar os parâmetros de  
95 crescimento: ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico para peso (TCEp),  
96 sobrevivência (S), conversão alimentar aparente (CAA), uniformidade do lote (U) de  
97 acordo com Furuya et al. (1998) e fator de condição relativo (Kn) de acordo com Le cren  
98 (1951).

99

#### 100 Análises de leucócitos e capacidade fagocítica

101 Ao final do experimento foram realizadas amostragens sanguíneas de nove peixes  
102 de cada tratamento por punção caudal, utilizando seringas umedecidas com EDTA a 3% e  
103 também sem anticoagulante. Do sangue coletado com EDTA, uma alíquota (10 µl) foi

104 utilizada para contagem do número total de eritrócitos (Er) em câmara de Neubauer, outra  
105 alíquota foi utilizada para as confecções das extensões sanguíneas para a contagem de  
106 trombócitos totais e diferencial de leucócitos (Ranzani-Paiva et al., 2013; Couto et al.,  
107 2017), sendo as lâminas coradas pancromicamente (Rosenfeld, 1947).

108 Para a análise da capacidade fagocítica, a cepa de *Aeromonas hydrophila* ativada  
109 em caldo BHI (Brain Heart Infusion) foi centrifugada a 1600g, lavada com solução salina  
110 estéril (NaCl 0,65%, SSE) e inativada com formalina a 10% por 1 hora, sendo novamente  
111 lavada em SSE e diluída na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, foi  
112 misturada uma alíquota de 0,5mL de sangue e 0,25mL da suspensão do patógeno inativo  
113 em tubos de polietileno e mantidos em 28 °C durante 30 min, homogeneizando-o a cada 10  
114 min (Pereira et al., 2016). Posteriormente, foram realizadas extensões sanguíneas em  
115 duplicatas que foram coradas pancromicamente pelo método Rosenfeld (1947). O número  
116 de leucócitos fagocíticos foram contados e calculados (CF=número de leucócitos  
117 fagocitantes/100 leucócitos) de acordo com Silva et al. (2005).

118

#### 119 Análises estatística

120 Os dados foram submetidos as premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e  
121 homocedasticidade (Levene's), posteriormente, submetidos a análise de variância  
122 (ANOVA) e teste Tukey (P<0,05), para separação média entre os tratamentos.

123

#### 124 **Resultado**

125 Os peixes alimentados com dietas contendo as concentrações de  $10^6$  e  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>  
126 de *E. faecium* por ração, tiveram aumento no ganho de peso ( $1,41 \pm 0,08$  g e  $1,54 \pm 0,10$  g),  
127 na taxa de crescimento específico para peso ( $2,07 \pm 0,10\%$  e  $2,15 \pm 0,14\%$ ), na uniformidade  
128 do lote ( $93,33 \pm 11,54\%$  e  $93,33 \pm 11,54\%$ ) e apresentaram uma menor conversão alimentar  
129 aparente ( $1,82 \pm 0,02$  e  $1,76 \pm 0,04$ ) durante os primeiros 30 dias. Nos 60 e 90 dias estes dois  
130 tratamentos apresentaram apenas melhora no ganho de peso e conversão alimentar (Tabela  
131 1), não sendo observada diferença para a sobrevivência e fator de condição ao longo do  
132 experimento.

133

134

135

136 Tabela 1. Desempenho produtivo de juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas sem  
 137 suplementação (C) e suplementadas com *E. faecium* na concentração de  $2,1 \times 10^4$  (T1),  $2,1$   
 138  $\times 10^6$  (T2) e  $2,1 \times 10^8$  (T3) UFC.g<sup>-1</sup> durante 90 dias.

	GP (g)	TCEp (%)	U (%)	CAA	S (%)	Kr
30 dias						
C	1.14±0.05 b	1.70±0.06 b	53.3±12.64 b	2.11±0.02 c	100±0.0 a	0.99±0.05 a
T1	1.35±0.09 ab	1.96±0.12 ab	73.3±11.54 ab	1.98±0.04 b	100±0.0 a	1.01±0.02 a
T2	1.41±0.08 a	2.07±0.10 a	93.33±11.54 a	1.82±0.02 a	100±0.0 a	0.99±0.06 a
T3	1.54±0.10 a	2.15±0.14 a	93.33±11.54 a	1.76±0.04 a	100±0.0 a	1.04±0.04 a
60 dias						
C	2.31±0.21 b	1.98±0.15 a	100±0.0 a	1.87±0.01b	100±0.0 a	1.03±0.05 a
T1	2.45±0.33 b	1.96±0.22 a	100±0.0 a	1.91±0.07b	100±0.0 a	0.98±0.02 a
T2	3.05±0.19 a	2.30±0.13 a	100±0.0 a	1.47±0.14 a	100±0.0 a	1.02±0.02 a
T3	3.14±0.11 a	2.20±0.14 a	100±0.0 a	1.52±0.10 a	100±0.0 a	1.00±0.06 a
90 dias						
C	2.70±0.34 b	1.40±0.17 a	100±0.0 a	1.79±0.04 b	100±0.0 a	0.99±0.01 a
T1	2.90±0.35 b	1.41±0.18 a	100±0.0 a	1.81±0.08 b	100±0.0 a	1.01±0.02 a
T2	3.96±0.39 a	1.66±0.16 a	100±0.0 a	1.50±0.04 a	100±0.0 a	1.02±0.01 a
T3	3.92±0.43 a	1.61±0.14 a	100±0.0 a	1.52±0.05 a	100±0.0 a	1.04±0.03 a

139 Valores (média±desvio padrão) na mesma coluna com letras diferentes diferem  
 140 estatisticamente pelo Tukey (0,05).

141

142 Em relação aos parâmetros imunológicos, houve aumento na quantidade de  
 143 trombócitos ( $34,18 \pm 2,37$  e  $33,42 \pm 2,31$  cel  $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), monócitos ( $10,99 \pm 1,47$  e  
 144  $11,26 \pm 0,91$  cel  $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e neutrófilos ( $19,19 \pm 2,12$  e  $18,35 \pm 1,45$  cel  $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) para os  
 145 peixes do tratamento 2 e 3, respectivamente (tabela 2). Assim como, aumento da  
 146 capacidade fagocítica ( $81,33 \pm 2,51$  e  $83,10 \pm 3,73\%$ ) nestes tratamentos (2 e 3) em relação  
 147 ao controle (figura 1).

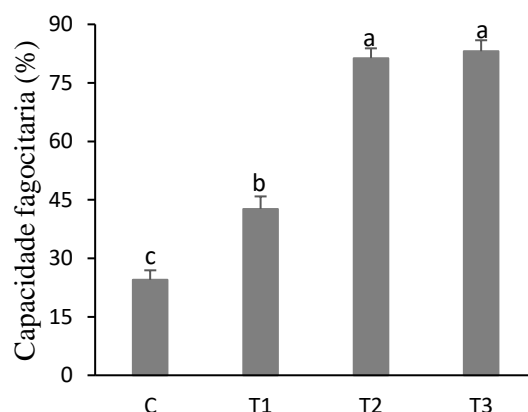
148

149 Tabela 2. Contagem de Trombócitos e leucócitos diferenciadas (cel  $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de juvenis  
 150 de *P. scalare* alimentados com dietas sem suplementação (C) e suplementadas com *E.*  
 151 *faecium* na concentração de  $2,1 \times 10^4$  (T1),  $2,1 \times 10^6$  (T2) e  $2,1 \times 10^8$  (T3) UFC.g<sup>-1</sup> durante  
 152 90 dias.

Tratamento	Trombócitos	Linfócito	Monócito	Neutrófilo	Basófilo
C	21,38±2,79b	35,27±1,87a	6,68±0,38b	9,78±0,27b	0,25±0,14a
T1	23,50±1,45b	36,41±1,09a	6,98±1,22b	10,19±0,50b	0,28±0,09a
T2	34,18±2,37a	36,33±3,78a	10,99±1,47a	19,19±2,12a	0,31±0,18a
T3	33,42±2,31a	35,94±2,46a	11,26±0,91a	18,35±1,45a	0,33±0,19a

153 Valores (média±desvio padrão) na mesma coluna com letras diferentes diferem  
 154 estatisticamente pelo Tukey (0,05).

155



156

157 Figura 1. Capacidade fagocitária de juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas sem  
 158 suplementação (C) e suplementadas com *E. faecium* na concentração de  $2,1 \times 10^4$  (T1),  $2,1$   
 159  $\times 10^6$  (T2) e  $2,1 \times 10^8$  (T3) UFC.g<sup>-1</sup> durante 90 dias. Valores (média±desvio padrão) com  
 160 letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente pelo Tukey (0,05).

161

## 162 **Discussão**

163 A modulação da microbiota intestinal nos peixes proporcionado pela  
 164 suplementação dietética com bactérias probióticas, vem demonstrando efeitos positivos na  
 165 higidez e até mesmo no desempenho produtivo dos peixes (Giri et al., 2013; Jatoba et al.,  
 166 2018; Dias et al., 2019). Esta modulação na microbiota intestinal devido a ingestão de  
 167 bactérias ácido lácticas, já foi relatada em *Oreochromis niloticus* (Jatobá et al., 2018),  
 168 *Astyanax bimaculatus* (Moraes et al., 2018), *Xiphophorus helleri* (Hoseinifar et al., 2015),  
 169 e *Carassius auratus* (Ahmadnia et al., 2017). No presente trabalho, o *E. faecium* foi capaz  
 170 de modular a microbiota intestinal, agindo crescimento e sistema imunológico dos acaráis  
 171 bandeira.

172 A colonização no trato intestinal é uma das primeiras premissas para uma bactéria  
 173 ser considerada probiótica e proporcionar efeitos benéficos ao hospedeiro (Dosta et al.  
 174 2012, Hassaan et al., 2017), como o crescimento. Este efeito promotor nos peixes é  
 175 relacionado com o aumento da vilosidade intestinal e dos estímulos das às enzimas  
 176 digestivas, que além de aumentar a absorção de nutrientes melhoram a digestibilidade e a  
 177 retenção de nutrientes, fatores estes que refletem em melhorias no desempenho de  
 178 crescimento (Munir et al., 2016; Dawood et al., 2017; Hussain et al., 2018).

179 Os peixes alimentados com dietas contendo  $2,1 \times 10^6$  (T2) e  $2,1 \times 10^8$  (T3) UFC.g<sup>-1</sup>  
 180 <sup>1</sup>, nos primeiros 30 dias, apresentaram aumento no ganho de peso, taxa de crescimento  
 181 específico para peso e menor conversão alimentar. Sendo que durante os 60 e 90 dias,

182 observou-se o aumento no ganho de peso e menor conversão alimentar. O aumento no  
183 desempenho produtivo dos juvenis de *P. scalare* além de ser reflexo de uma melhora  
184 morfológica intestinal, também pode ser atribuída na melhora da digestão proporcionada  
185 pela bactéria probiótica *E. faecium*, fato também já relatado em *O. niloticus* (Abumourad  
186 et al., 2014), *Cyprinus carpio* (Dehaghani et al., 2015), *Oncorhynchus mykiss* (Abedian  
187 Amiri et al., 2017) e *Labeo rohita* (Ghori et al., 2018).

188 Em estudo prévio, Dias et al. (2019) observaram aumento no ganho de peso, taxa  
189 de crescimento específico para peso e menor conversão alimentar em pós larvas de *P.*  
190 *scalare*, com peso inicial de 0,02g, que foram alimentados com dietas contendo a bactéria  
191 probiótica *E. faecium* na concentração de  $2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de ração durante 40 dias,  
192 obtendo-se ao final do experimento os maiores pesos finais de  $1,76 \pm 0,01$  e  $1,45 \pm 0,01$ g,  
193 respectivamente, em relação ao controle. Em continuidade aos estudos com a bactéria  
194 autóctone *E. faecium* para a espécie *P. scalare*, observou-se que o efeito promissor desta  
195 bactéria no desempenho produtivo continuou no presente trabalho em peixes com maior  
196 peso inicial de  $1,68 \pm 0,4$  g e além disso nesses peixes maiores também foi possível verificar  
197 o efeito benéfico imunológico da suplementação com *E. faecium*.

198 Os juvenis de *P. scalare* alimentados com dietas contendo  $2,1 \times 10^6$  (T2) e  $2,1 \times 10^8$   
199 (T3) UFC.g<sup>-1</sup> de ração, tiveram aumento na quantidade de células de trombócitos, neutrófilo  
200 e monócito e aumento da capacidade fagocítica, evidenciando o efeito imunoestimulante.  
201 Efeito este, similar aos achados por Ghori et al. (2018) em *L. rohita*, Hamid et al., (2018)  
202 em *Clarias gariepinus*, Mouriño et al. (2015) em híbrido de surubim (*Pseudoplatystoma*  
203 *reticulatum* x *P. corruscans*), Jatobá et al. (2018) em *Astyanax bimaculatus*, Dias et al.  
204 (2018) em *Colossoma macropomum* e Jatobá et al. (2011) em *O. Niloticus*, alimentados  
205 com bactérias probióticas

206 Essa melhora do sistema imunológico foi estimulada pela aderência das bactérias  
207 probióticas nos sítios de ligação na mucosa intestinal, estimulando a imunidade celular e  
208 humoral (Giri et al., 2012; Mello et al., 2013; Mouriño et al., 2015; Hoseinifar et al., 2018;  
209 Dias et al., 2018). Assim, podemos aferir que os juvenis de *P. scalare* podem ter adquirido  
210 maior resistência a infecções patogênicas, devido ao aumento dos leucócitos e capacidade  
211 fagocitária, nos peixes do tratamento 2 e 3.

212 Este efeito promissor da suplementação de bactérias probióticas na imunidade dos  
213 peixes ornamentais são relatados no muco de *P. scalare* (Azimirad et al., 2016) e  
214 *Xiphophorus helleri* (Hoseinifar et al., 2015), assim como na corrente sanguínea das  
215 espécies *Astronotus ocellatus* (Safari e Atash, 2013) e *Aequidens rivulatus* (Neissi et al.,

216 2013). Estes relatos corroboram os benefícios do uso de probiótico no cultivo dos juvenis  
217 de *P. scalare*, possibilitando maior resistência desses animais diante de condições adversas  
218 ao cultivo e até mesmo a infecções patogênicas (Mouriño et al., 2015; Falaye et al., 2017;  
219 Jesus *et al.* 2016; Ahmadifard et al., 2018).

220

## 221 **Conclusão**

222 A bactéria autóctone *E. faecium* suplementada nas dietas para juvenis de *P. scalare* na  
223 concentração de  $2,1 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> proporcionou aumento do desempenho de crescimento  
224 e melhoria no sistema imunológico, podendo ser utilizado como estratégia para o  
225 desenvolvimento da criação desta espécie.

226

## 227 **Referências**

228 Abarike, E. D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., ... & Kuebutornye, F. K. (2018).  
229 Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus*  
230 *licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia,  
231 *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 82, 229-238.

232 Abarike, E. D., Kuebutornye, F. K., Jian, J., Tang, J., Lu, Y., & Cai, J. (2018). Influences  
233 of immunostimulants on phagocytes in cultured fish: a mini review. *Reviews in*  
234 *Aquaculture*.

235 Abarike, E. D., Kuebutornye, F. K., Jian, J., Tang, J., Lu, Y., & Cai, J. (2018). Influences  
236 of immunostimulants on phagocytes in cultured fish: a mini review. *Reviews in*  
237 *Aquaculture*.

238 Ahmadifard, N., Aminlooi, V. R., Tukmechi, A., & Agh, N. (2018). Evaluation of the  
239 impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on growth performance,  
240 reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental  
241 fish *Poecilia latipinna*. *Probiotics and antimicrobial Proteins*, 1-9.

242 Ahmadifard, N., Aminlooi, V. R., Tukmechi, A., & Agh, N. (2018). Evaluation of the  
243 impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on growth performance,  
244 reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental  
245 fish *Poecilia latipinna*. *Probiotics and antimicrobial Proteins*, 1-9.

246 Ahmadnia Motlagh, H., Hajimoradlo, A., Gorbani, R., Agh, N., Safari, O., & Bami, M. L.  
247 (2017). Reproductive performance and intestinal bacteria changes of *Carassius auratus*  
248 (Linnaeus, 1758) brood stocks fed dietary supplemented by lactoferrin and *Lactobacillus*  
249 *rhamnosus* PTCC 1637. *Iranian Journal of Ichthyology*, 4.

250 Ahmadnia Motlagh, H., Hajimoradlo, A., Gorbani, R., Agh, N., Safari, O., & Bami, M. L.  
251 (2017). Reproductive performance and intestinal bacteria changes of *Carassius auratus*  
252 (Linnaeus, 1758) brood stocks fed dietary supplemented by lactoferrin and *Lactobacillus*  
253 *rhamnosus* PTCC 1637. *Iranian Journal of Ichthyology*, 4.

254 Anuar, N. S., Omar, N. S., Noordiyana, M. N., & Sharifah, N. E. (2017). Effect of  
255 commercial probiotics on the survival and growth performance of goldfish *Carassius*  
256 *auratus*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 10(6), 1663-1670.

257 Azevedo, R. V., Fosse Filho, J. C., Pereira, S. L., Andrade, D. R., & Júnior, V. (2016).  
258 Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852,  
259 Perciformes, Osphronemidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*  
260 *Zootecnia*, 68(3), 795-804.

261 Azimirad, M., Meshkini, S., Ahmadifard, N., & Hoseinifar, S. H. (2016). The effects of  
262 feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult  
263 *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and  
264 performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Fish & shellfish immunology*, 54, 516-  
265 522.

266 Dawood, M.A.; Koshio, S.; Esteban, M.Á. 2017. Beneficial roles of feed additives as  
267 immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*.  
268 <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12209>.

269 Elsabagh, M., Mohamed, R., Moustafa, E. M., Hamza, A., Farrag, F., Decamp, O., ... &  
270 Eltholth, M. (2018). Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water  
271 quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia,  
272 *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture nutrition*, 24(6), 1613-1622.

273 Elsabagh, M., Mohamed, R., Moustafa, E. M., Hamza, A., Farrag, F., Decamp, O., ... &  
274 Eltholth, M. (2018). Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water  
275 quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia,  
276 *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture nutrition*, 24(6), 1613-1622.

277 Evaluation of the Impacts of Long-Term Enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on  
278 Growth Performance, Reproduction, Intestinal Microflora, and Resistance to *Aeromonas*  
279 *hydrophila* of Ornamental Fish *Poecilia latipinna*

280 Fujimoto, R. Y., Santos, R. F. B., Dias, H. M., Ramos, F. M., Silva, D. J. F., & Honorato,  
281 C. A. (2016). Feeding frequency on the production viability of production and quantitative  
282 descriptors of parasitism in angelfish. *Ciência Rural*, 46(2), 304-309.

283 Gallani, S. U., Sebastião, F. D. A., Valladão, G. M., Boaratti, A. Z., & Pilarski, F. (2016).  
284 Pathogenesis of mixed infection by *Spironucleus* sp. and *Citrobacter freundii* in freshwater  
285 angelfish *Pterophyllum scalare*. *Microbial pathogenesis*, *100*, 119-123.

286 Giri, S. S., Sen, S. S., & Sukumaran, V. (2012). Effects of dietary supplementation of  
287 potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease  
288 resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology*, *32*(6),  
289 1135-1140.

290 Guimaraes, M. C., de Carla Dias, D., de Araujo, F. V. A. P., Ishikawa, C. M., & Tachibana,  
291 L. (2019). PROBIOTIC *Bacillus subtilis* AND *Lactobacillus plantarum* IN DIET OF NILE  
292 TILAPIA. *Boletim do Instituto de Pesca*, *45*(1).

293 Hamid, N. H., Daud, H. M., Srisapoome, P., Abu, H., Yusoff, M., & Bakar, S. N. A. (2018).  
294 Effect of putative probiont *Enterococcus hirae* on the hematological parameters of juvenile  
295 African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) during pre-and post-challenge against  
296 *Aeromonas hydrophila*. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, *14*(3),  
297 423-428.

298 Havixbeck JJ, Rieger AM, Wong ME, Hodgkinson JW, Barreda DR (2016) Neutrophil  
299 contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost  
300 fish. *J Leukoc Biol* *99*(2):241–252

301 Havixbeck, J. J., Rieger, A. M., Wong, M. E., Hodgkinson, J. W., & Barreda, D. R. (2016).  
302 Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory  
303 response in teleost fish. *Journal of leukocyte biology*, *99*(2), 241-252.

304 Hoseinifar, S. H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., & Vakili, F. (2015). The effects of  
305 *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters,  
306 intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail  
307 (*Xiphophorus helleri*). *Fish & shellfish immunology*, *42*(2), 533-538.

308 Hoseinifar, S. H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., & Vakili, F. (2015). The effects of  
309 *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters,  
310 intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail  
311 (*Xiphophorus helleri*). *Fish & shellfish immunology*, *42*(2), 533-538.

312 Hoseinifar, S. H., Sun, Y., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases  
313 control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in*  
314 *microbiology*, *9*, 2429.)

315 Hoseinifar, S. H., Zoheiri, F., & Caipang, C. M. (2016). Dietary sodium propionate  
316 improved performance, mucosal and humoral immune responses in Caspian white fish  
317 (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish & shellfish immunology*, *55*, 523-528.

318 Hussain, S. M., Aslam, N., Javid, A., Liaquat, S., Shahzad, M. M., Arsalan, M. Z. U. H.,  
319 & Khalid, M. A. (2018). Efficacy of Probiotics Supplementation on Mineral Digestibility,  
320 Haematological Parameters and Carcass Composition of *Oreochromis niloticus*  
321 Fingerlings Fed Canola Meal Based Diets. *Pakistan Journal of Zoology*, *50*(5).

322 Jatobá, A., Pereira, M. O., Vieira, L. M., Bitencourt, M., Rodrigues, E., Fachini, F. A., &  
323 Moraes, A. V. (2018). Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile  
324 tilapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *70*(1), 327-332.

325 Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of intestinal absorption and  
326 secretion. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, *30*(2), 145-159.

327 Lee, S., Katya, K., Park, Y., Won, S., Seong, M., & Bai, S. C. (2017). Comparative  
328 evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum*  
329 KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and  
330 disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish & shellfish immunology*, *61*,  
331 201-210.

332 Li, X., Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Lauzon, H. L., Birkbeck, H., & Yang, D. (2018). The  
333 adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract. *Reviews in*  
334 *Aquaculture*.

335 Li, Z., Bao, N., Ren, T., Han, Y., Jiang, Z., Bai, Z., ... & Ding, J. (2019). The effect of a  
336 multi-strain probiotic on growth performance, non-specific immune response, and  
337 intestinal health of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Fish physiology and*  
338 *biochemistry*, 1-15.

339 Ma, R., Liu, X., Meng, Y., Wu, J., Zhang, L., Han, B., ... & Li, C. (2019). Protein nutrition  
340 on sub-adult triploid rainbow trout (1): Dietary requirement and effect on anti-oxidative  
341 capacity, protein digestion and absorption. *Aquaculture*, *507*, 428-434.

342 Mehdinejad, N., Imanpour, M. R., & Jafari, V. (2018). Combined or individual effects of  
343 dietary probiotic, *Pediococcus acidilactici* and nucleotide on reproductive performance in  
344 goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-6.

345 Mehdinejad, N., Imanpour, M. R., & Jafari, V. (2019). Combined or individual effects of  
346 dietary probiotic, *Pediococcus acidilactici* and nucleotide on reproductive performance in  
347 goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and antimicrobial proteins*, *11*(1), 233-238.

348 Mello, H. D., Moraes, J., Niza, I. G., Moraes, F. R. D., Ozório, R., Shimada, M. T., ... &  
349 Claudiano, G. (2013). Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-  
350 do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 724-730.

351 Minghetti, M., Drieschner, C., Bramaz, N., Schug, H., & Schirmer, K. (2017). A fish  
352 intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus*  
353 *mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell biology and toxicology*, 33(6), 539-555.

354 Mohammadi Arani, M., Salati, A. P., Safari, O., & Keyvanshokoo, S. (2019). Dietary  
355 supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance,  
356 digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*  
357 *Nutrition*, 25(4), 854-861.

358 Moraes AV, de Oliveira Pereira M, Moraes KN, Rodrigues-Soares JP, Jesus GFA, Jatoba  
359 A. Autochthonous probiotic as growth promoter and immunomodulator for *Astyanax*  
360 *bimaculatus* cultured in water recirculation system. *Aquac Res.* 2018;00:1–7.  
361 <https://doi.org/10.1111/are.13743>

362 Moraes, A. V. D., Pereira, M. D. O., Moraes, K. N., Rodrigues-Soares, J. P., Jesus, G. F.  
363 A., & Jatobá, A. (2018). Autochthonous probiotic as growth promoter and  
364 immunomodulator for *Astyanax bimaculatus* cultured in water recirculation  
365 system. *Aquaculture research*, 49(8), 2808-2814.

366 Munir, M. B., Hashim, R., Chai, Y. H., Marsh, T. L., & Nor, S. A. M. (2016). Dietary  
367 prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility and the  
368 expression of immune regulatory genes in snakehead (*Channa striata*)  
369 fingerlings. *Aquaculture*, 460, 59-68.

370 Neissi, A., Rafiee, G., Nematollahi, M., & Safari, O. (2013). The effect of *Pediococcus*  
371 *acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune  
372 responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1976-  
373 1980.)

374 Oluyemi, K. G. (2019). Histometry and Growth Performance of African Catfish, *Clarias*  
375 *garipepinus*, (Burchell, 1822) Fed Probiotics Supplemented Diets. *Asian Journal of*  
376 *Research in Zoology*, 1-10.

377 Ramos, M. A., Gonçalves, J. F., Costas, B., Batista, S., Lochmann, R., Pires, M. A., ... &  
378 Ozório, R. O. (2017). Commercial bacillus probiotic supplementation of rainbow trout  
379 (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): Growth, immune responses and  
380 intestinal morphology. *Aquaculture research*, 48(5), 2538-2549.

381 Ruiz, M. L., Owatari, M. S., Yamashita, M. M., Ferrarezi, J. V. S., Garcia, P., Cardoso, L.,  
382 ... & Mouriño, J. L. P. (2019). Histological effects on the kidney, spleen, and liver of Nile  
383 tilapia *Oreochromis niloticus* fed different concentrations of probiotic *Lactobacillus*  
384 *plantarum*. *Tropical animal health and production*, 1-10.

385 Safari, O., & Atash, M. S. (2013). Study on the effects of probiotic, *Pediococcus acidilactici*  
386 in the diet on some biological indices of *Oscar astronoutsocellatus*. *International Research*  
387 *Journal of Applied and Basic Sciences*, 4(11), 3458-3464.

388 Silva, W. F., Ranzini-Paiva, M. J. T., & Santos, A. A. (2017). CARACTERIZAÇÃO DAS  
389 CÉLULAS PERITONEAIS E ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS DO  
390 ROBALO PEVA (*CENTROPOMUS PARALLELUS*). *Acta Scientiae Biological*  
391 *Research*, 2(2), 33-53.

392 Soonthonsrima, T., Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., &  
393 Longyant, S. (2019). Generation of mouse monoclonal antibodies specific to tilapia  
394 immunoglobulin using fish immunoglobulin/BSA complex for monitoring of the immune  
395 response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture research*, 50(1), 277-283.