



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical

Mestrado e Doutorado

UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil

LUIZ ALBERTO SABIONI

Desempenho zootécnico e resposta hematológica de *Colossoma macropomum*
suplementado com probióticos em duas densidades de estocagem

MACAPÁ, AP

2018

LUIZ ALBERTO SABIONI

Desempenho zootécnico e resposta hematológica de *Colossoma macropomum*
suplementado com probióticos em duas densidades de estocagem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

MACAPÁ, AP

2018

LUIZ ALBERTO SABIONI

Desempenho zootécnico e resposta hematológica de *Colossoma macropomum*
suplementado com probióticos em duas densidades de estocagem

Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá

Dr. Marcos Tavares Dias

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá

Dr. Tiago Gabriel Correia

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Aprovada em 26 de março de 2018, Macapá, AP, Brasil

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meu pais que sempre me incentivaram a me dedicar aos estudos com seriedade desde os primeiros passos na vida acadêmica.

À minha esposa Saraya e aos meus filhos Saulo, Sofia e Lucca, por compartilharem desse momento, dando suporte para enfrentar todos os desafios da vida.

Aos demais familiares e amigos em especial ao meu irmão Dr. Rafael Sabioni pela relevante contribuição que deu ao trabalho.

À Embrapa Amapá; em especial ao Analista Leandro Fernandes Damasceno, pelo auxílio em análises de extrema relevância para o trabalho.

À toda a equipe do laboratório de fisiologia e nutrição de organismos aquáticos da Embrapa Amapá, que ajudou na preparação e manutenção do experimento, além da coleta e processamento das amostras.

Em especial à minha Orientadora Profa. Dra. Eliane Yoshioka que cumpriu seu papel de orientação com excelência.

A todos os docentes e colegas do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBio) da Universidade Federal do Amapá por compartilharem comigo dos seus conhecimentos nesses prazerosos dois anos que passei na instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos financeiros.

RESUMO

Sabioni, Luiz Alberto. Desempenho zootécnico e resposta hematológica de *Colossoma macropomum* suplementado com probióticos em duas densidades de estocagem. Macapá, 2018. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

A aquicultura do tambaqui está em franca expansão no Brasil e novas tecnologias devem ser produzidas e implantadas para se obter produções mais eficientes e sustentáveis do ponto de vista econômico e ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de rações com probiótico comercial (Lacto-Sacc®) em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), em duas densidades de estocagem, nos parâmetros de sobrevivência, crescimento (comprimento final, peso final, ganho de peso), produção de biomassa (ganho relativo em biomassa), utilização do alimento (conversão alimentar aparente, índice hepato-somático e índice viscero-somático) e hematológicos (hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, volume corpuscular médio, concentração corpuscular de hemoglobina e concentração média corpuscular de hemoglobina e atividade respiratória de leucócitos). Tambaquis (n= 180, com aproximadamente 50 g) foram distribuídos em 12 tanques (250 L), em duas densidades (2,5 Kg/m³ e 5 Kg/m³), em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Durante 30 dias, metade dos animais estocados em cada densidade recebeu ração suplementada com probiótico, enquanto a outra metade não. O aumento da densidade de estocagem não influenciou a sobrevivência ($P > 0,05$) dos peixes, embora tenha causado a redução do crescimento e utilização do alimento. A suplementação com probiótico promoveu o crescimento dos peixes e melhorou a utilização dos nutrientes do alimento no grupo estocado na menor densidade. Nenhuma diferença ($P > 0,05$) nas análises hematológicas foi observada entre os grupos testados.

Palavras-chave: Piscicultura, Amazônia, nutrição, sangue, suplementação.

ABSTRACT

Sabioni, Luiz Alberto. Zootechnical performance and hematological response of *Colossoma macropomum* juveniles fed probiotics and farmed at two stocking densities. Macapá, 2018. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Tambaqui farming is expanding in Brazil and new technologies need to be implemented in order to achieve production increasing, more effective and sustainable, from the economic and environmental points of view. The aim of the present study was to evaluate the effect of feed supplementation with a commercial probiotic (Lacto-Sacc®), on juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*), at two stocking densities, regarding the following parameters: survival, growth (final weight, final length, weight gain), biomass production (relative biomass gain), feed use (apparent feed conversion, hepatosomatic index, and viscerosomatic index) and hematological parameters (hematocrit, hemoglobin concentration, erythrocyte count, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration and leukocytes respiratory burst activity). Tambaqui (n= 180, approximately 50 g) were distributed into 12 tanks (250 L), at two densities (2.5 kg m⁻³ and 5 kg m⁻³), in an entirely randomized design, with three repetitions. For each density, half of the stocked fish received feed supplemented with probiotics for 30 days, while the other half received non-supplemented feed. Increasing the stocking density did not influence fish survival (P > 0.05), although it caused reductions in growth and feed use in the groups stocked at the highest density. Changing the stocking density and adding probiotic supplementation to the tambaqui's diet did not affected their hematological parameters. Probiotic supplementation caused fish growth when fish were stocked at the lowest density, probably due to better utilization of dietary nutrients.

Keywords: fish farm, Amazon, weight gain, blood, supplementation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	08
1.1 Aquicultura	08
1.2 Piscicultura do tambaqui	09
1.3 Densidades de estocagem e consequências sobre os peixes	09
1.4 Qualidade da água.....	10
1.5 Nutrição de peixes	11
1.5 a Probióticos na nutrição de peixes	12
1.6 Adensamento, fisiologia e hematologia	13
2. HIPÓTESES	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Geral	15
3.2 Específicos.....	15
4. REFERÊNCIAS	16
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
6. CONCLUSÕES	40

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aquicultura

A produção de proteína, pelo cultivo de animais aquáticos, vem ganhando espaço antes ocupado pela pesca extrativa por se mostrar uma opção de uso sustentável dos recursos naturais, enquanto a pesca explora esses recursos. Nos estados da região Norte, a pesca extrativa também tem grande relevância, sendo a média de consumo de peixe *per capita* (17,5 kg/*per capita*/ano) maior em comparação com o restante do Brasil (4 kg/*per capita*/ano) (Freitas et al. 2015).

A aquicultura representa o cultivo de moluscos, crustáceos, peixes, plantas aquáticas, dentre outros organismos aquáticos de maneira manejada e tecnificada, visando o aumento da produção e o lucro. Esta atividade cresceu de um milhão de toneladas em 1970 para 59,4 milhões de toneladas em 2004, chegando a 106 milhões de toneladas em 2015, tornando-se mais significativa na produção mundial (FAO 2016), e continua crescendo em taxas maiores que a pesca e a pecuária. Economicamente, o cultivo de pescado é mais seguro quando comparado à pesca extrativista, pois nesta não se tem certeza de retorno financeiro. Na pesca, fatores que influenciam na quantidade e qualidade do produto não são totalmente previsíveis, sendo considerado um empreendimento de maior risco. Contudo, a aquicultura tende a ser um tipo de produção mais sustentável, capaz de proporcionar lucros e desenvolvimento social, aumentando a produção de alimento sem oferecer riscos à conservação ambiental (Oliveira 2009).

No Brasil, apesar da extensa faixa litorânea, a maior parte da produção de peixes (69,7%) é proveniente da aquicultura continental, com projeções de crescimento, principalmente devido à abundância de água doce, grande extensão territorial e existência de espécies nativas bem adaptáveis ao cultivo (IBAMA 2007; Boscolo et al., 2011). O pescado representa um componente importante na alimentação dos povos da Amazônia, onde o cultivo intensivo vem se intensificando nos últimos anos (Oliveira 2009). Muitas atividades de pesquisa estão sendo realizadas na busca de tecnologias, desenvolvidas para a aquicultura de forma a otimizar a produção correspondendo à crescente demanda de pescado.

1.2 Cultivo do tambaqui

O *Colossoma macropomum* (tambaqui) é a espécie nativa brasileira mais produzida pela piscicultura, apresentando bom desempenho em cultivos intensivos e bom valor de mercado (IBGE 2016). A produção nacional de tambaqui já foi de origem quase que exclusivamente da pesca tradicional, porém hoje a produção da piscicultura supera à da pesca (MPA 2012). O sucesso na criação desta espécie amazônica está associado a características como: crescimento rápido, rusticidade, tolerância à baixa concentração do oxigênio dissolvido na água, boa aceitação de dietas formuladas e boa adaptação a técnicas de reprodução em cativeiro (Silva et al. 2007). Em lagos de várzea da Amazônia central, o cultivo de tambaqui em tanques-rede tem alcançado alta produtividade (Chagas et al. 2003), indicando que essa atividade pode ser promissora também para a subsistência de populações ribeirinhas da região.

A criação do tambaqui pode ser uma atividade lucrativa, além de favorecer a conservação através do manejo sustentável, diminuindo a pressão de pesca sobre os estoques naturais da espécie (Bressane 2010). Além disso, mostra-se como uma alternativa para corresponder à crescente demanda de produção de alimento, atendendo aos padrões de qualidade e preço exigidos pelos consumidores. Investimentos em pesquisa são importantes para desenvolver sistemas de cultivo apropriados às necessidades da sociedade, às demandas do mercado interno e externo (Rotta and Queiroz 2003; Dairiki and Silva 2011), incluindo estudos que determinem os principais parâmetros de qualidade para o tambaqui, técnicas de alimentação usando probióticos, densidade de estocagem, vida de prateleira (Freitas et al. 2015), a sustentabilidade a capacidade de gerar empregos e renda entre outras questões que compõem a cadeia produtiva no Brasil e no exterior.

1.3 Densidades de estocagem e consequências sobre os peixes.

Na piscicultura intensiva, os animais são acomodados em altas densidades de estocagem, sendo que vários estudos procuram determinar a densidade considerada ótima para cada local e para cada estágio do cultivo (Lage et al. 1999, Brandão et al. 2004, Gomes et al. 2006, Pedreira et al. 2010, Silva et al. 2013, Silva and Fujimoto 2015, Azevedo et al. 2016, Rodrigues et al. 2016), que é um fator crítico na definição de um eficiente sistema de produção para o tambaqui.

O aumento da densidade de estocagem pode resultar em estresse para os peixes, levando ao aumento da exigência de energia, reduzindo seu crescimento e utilização de alimento, além de causar doenças (Chagas et al. 2003, Gomes et al. 2004, Turra et al. 2009). Em peixes, a resposta fisiológica às situações de estresse pode ser similar à encontrada em outros vertebrados e podem levar a uma redução significativa da produtividade no cultivo (Urbinati e Carneiro 2004).

A densidade de estocagem ideal para o tambaqui depende da qualidade da água do cultivo, da renovação de água (rios, lagos, tanques escavados, canais de irrigação) e da fase da criação (alevinagem, recria, engorda), podendo variar de um indivíduo por m³ até mais de 600 indivíduos por m³ (Silva et al. 2013; Queiroz e Rotta, 2016) dependendo da modalidade de cultivo. Por isso a importância de se explorar esse tema.

1.4 Qualidade da água

A qualidade da água de cultivo merece atenção especial, características tais como temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD), dureza, condutividade, amônia, entre outras, que devem ser monitoradas para se obter sucesso na produção, pois estão diretamente relacionados com o desenvolvimento dos peixes (Silva and Fujimoto 2015). O método de determinação e a frequência do monitoramento de cada parâmetro, depende da modalidade de cultivo e espécie cultivada.

A água doce contém quantidades variáveis de substâncias dissolvidas (sais e compostos orgânicos) que variam de acordo com o solo onde a água se encontra, logo deve ser monitorada quando utilizada para aquicultura (Mallasen et al. 2012). A qualidade dos efluentes da aquicultura é uma das maiores preocupações, já que não se deseja causar impactos negativos ao meio ambiente. O manejo inadequado de viveiros, tanques-rede, dentre outros modos de produção, pode resultar em uma potencial fonte poluidora. O acúmulo de fosfato pode aumentar a atividade bacteriana, podendo resultar na produção de gás sulfídrico e metano causando intoxicação nos peixes (Gross et al. 1998, Rotta e Queiroz 2003). É importante considerar que os restos da ração somados aos dejetos dos peixes cultivados podem causar alterações na qualidade da água e no equilíbrio ecológico dos ambientes de cultivo, influenciando diretamente no cultivo (Gomes et al. 2002).

Informações sobre o clima e hidrodinâmica do local escolhido para criação são importantes para monitorar a temperatura da água, por afetar diretamente o cultivo. A escolha do local de cultivo é importante, assim como determinar a capacidade suporte do ambiente escolhido. Os parâmetros físicos e químicos da água devem estar dentro de uma faixa considerada ideal para a produção da espécie cultivada (Boyd and Tucker, 1998).

A diminuição da produtividade de peixes tem relação direta com fatores físicos, químicos, biológicos e operacionais que devem ser controlados para uma produção satisfatória. Schmittou (1997) identificou características da água relacionadas a situações de estresse com consequente queda na produtividade como, temperaturas muito baixas ($<12^{\circ}\text{C}$) ou muito altas ($>33^{\circ}\text{C}$), redução da concentração de OD ($<3,0\text{ mg/L}$), pH muito baixo ($< 5,5$) ou muito alto ($>9,5$), baixa alcalinidade total ($<20\text{ mg/dl CaCO}_3$), baixa dureza total ($<10\text{ mg/dL CaCO}_3$), altas concentrações de amônia e nitrito ($>0,02\text{ ppm}$ e $>0,1\text{ ppm}$, respectivamente). Porém, além das boas práticas na atividade piscícola o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água são relevantes para manter os padrões ideais para a criação imprescindíveis para o sucesso da produção e a sustentabilidade da atividade. A frequência de monitoramento dos padrões físicos e químicos da água também é importante. Assim, além de determinar variáveis importantes deve-se estipular o intervalo de aferições das variáveis aquáticas (Boyd e Tucker 1998; Parron et al., 2011).

1.5 Nutrição de peixes

A nutrição representa um importante pilar na sustentação de qualquer tipo de cultivo, devendo sempre ser realizada de maneira balanceada. O manejo alimentar é de grande importância para o êxito da produção de tambaqui em pisciculturas (Chagas et al. 2007), pois o manejo inadequado pode trazer complicações para o cultivo e causar prejuízos financeiros ao piscicultor. A falta de conhecimento sobre as necessidades nutricionais, densidade de estocagem adequada, instalações e manejo adequados dos peixes pode causar problemas nutricionais, além de doenças parasitárias e infecciosas (Varela et al. 2003).

A utilização de ração balanceada na piscicultura surgiu da possibilidade de se adaptar rações utilizadas para aves e suínos, e evoluiu para a produção de rações específicas para

peixes, passando pela peletização e chegando às rações extrusadas para peixes carnívoros e onívoros (Cyrino e Fracalossi 2012). Embora a extrusão aumente no custo final da ração, comparada à ração peletizada, este custo adicional acaba sendo compensado pela redução nos custos da produção, com a melhoria da eficiência alimentar dos peixes e diminuição da deterioração da qualidade da água (Cyrino e Fracalossi 2012).

O alto preço da ração no Estado do Amapá é um fator limitante à aceitação da aquicultura pelos investidores (Oliveira 2012), já que os custos com ração podem representar de 60 a 70% do custo total da produção (Cyrino et al. 2004). Muitos estudos procuram, com resultados promissores, fontes proteicas alternativas de mais fácil acesso na região, como por exemplo a semente da castanha da Amazônia (*Bertholletia excelsa*) (Santos et al. 2010b) e outras alternativas, como a adição de milho e soja cozidos (Obayoshioka et al. 2015), como fonte de nutrientes e de energia na dieta para tambatingas (*C. macropomum* x *Piaractus brachypomus*).

A formulação de rações deve também ser adequada a cada fase de crescimento dos animais com foco no balanço entre energia e proteína de acordo com as exigências da espécie. Poucos trabalhos procuram determinar as exigências de aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais (Boscolo et al. 2011). A proteína representa a parte mais dispendiosa da ração (Santos et al. 2010a). Assim determinar o requerimento proteico para a espécie de peixe é importante para a viabilidade do cultivo. Nem sempre a ração com maior nível de proteína oferecerá melhores resultados na produção, pois a relação entre a energia e a proteína da dieta deve ser balanceada para alcançar melhores resultados (Gutiérrez et al. 2012). Uma ração com porções de energia e proteína desbalanceadas podem resultar em baixo desempenho nos sistemas de cultivo (Lovell 1989). Uma alta quantidade de energia pode levar os animais à saciedade antes de ingerirem a quantidade necessária de aminoácidos para o seu melhor desempenho, prejudicando o ganho de peso e inclusive o sistema imune, tornando os animais mais susceptíveis a doenças (Aliyu-Paiko et al. 2010, NRC 2011). Portanto, é necessário investigar o desempenho produtivo da espécie cultivada com diferentes dietas.

1.5 a Probióticos na nutrição de peixes

Antibióticos são utilizados na piscicultura como medida profilática e contra doenças. No entanto, impactam a microbiota do ambiente aquático e podem deixar resíduos na carne, além de provocar a resistência de microrganismos patogênicos (Cabello 2006).

Vacinas também estão sendo amplamente utilizadas com resultados satisfatórios, principalmente quando combinadas à imunoestimulantes (Anderson 1992), porém não podem ser utilizadas em todas as fases de desenvolvimento. Por conta disto, o uso de microrganismos na dieta como imunoestimulante (probióticos), tem sido uma alternativa para o controle de doenças nos plantéis (Kiron 2012).

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas podem conferir benefícios à saúde dos animais, melhorando o equilíbrio da microbiota do intestino. A suplementação de dietas com probióticos é amplamente utilizada na produção animal, incluindo peixes (Bajagai et al. 2016). Benefícios relacionados ao uso de probióticos na aquicultura como exclusão competitiva de patógenos (Jiang et al. 2013), fonte nutricional e contribuição enzimática na digestão (Balcázar et al. 2006, Carnevali et al. 2006), aumento da resposta imune contra patógenos (Balcázar et al. 2004, Gonçalves et al. 2011) e efeitos antivirais já foram descritos (Lakshmi et al. 2013).

O efeito do uso de probióticos na alimentação de peixes ainda não está totalmente compreendido e diferentes microrganismos apresentam diferentes mecanismos de ação (Bajagai et al. 2016). Entretanto, diversos trabalhos já relataram efeitos benéficos desse tipo de suplementação em peixes. A suplementação de dietas com probióticos já foi relacionada com diminuição do estresse causado por intensos adensamentos em tilápias (Gonçalves et al. 2011). Azevedo et al. (2016) observaram aumento nos parâmetros de crescimento, utilização do alimento, além da melhora de parâmetros econômicos utilizando o probiótico *Bacillus subtilis* e os efeitos sinérgicos da sua associação com prebiótico mananoligossacarídeo oriundo da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em juvenis de tambaquis.

1.6 Adensamento, fisiologia, hematologia e uso de probióticos

A hematologia é usada como ferramenta para detecção de alterações fisiológicas que possam estar comprometendo o desenvolvimento dos animais nos cultivos (Ranzani-Paiva et al. 2013). Já a hematologia clínica é uma ferramenta importante no diagnóstico de patologias, acompanhamento de alterações nas células sanguíneas e plasma, podendo ser

indicador de condições patológicas (Satake et al. 2009). Além disso, pode ser utilizada como método de avaliação das exigências nutricionais de peixes.

Apesar de alguns estudos não correlacionarem efeitos do adensamento populacional de peixes com as variáveis hematológicas testadas de tambaquis (Chagas et al. 2003, Gomes et al. 2004), este monitoramento é necessário para avaliar a viabilidade do cultivo e diferentes densidades testadas, mostrando até que ponto (densidade de estocagem) o potencial de crescimento dos peixes não é afetado. Lima et al. (2015) ao avaliar o uso do probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta de *Leporinus microcephalus*, não encontrou variações das respostas hematológicas dos animais. Paixão et al. (2017) relatou um aumento do número das células brancas e vermelhas em tambaquis suplementados com probiótico comercial contendo *S. cerevisiae*, proporcional ao tempo de exposição ao microrganismo.

Desta forma, estudos relacionados à fisiologia e aos índices de produção da espécie em diferentes modalidades de cultivo são de grande importância para avaliação da viabilidade dos cultivos, buscando a produção de alimentos na região amazônica de maneira sustentável e com responsabilidade.

A produção do tambaqui no Brasil e, especialmente, na Amazônia, requer a adoção de boas práticas de produção buscando tecnologias para o melhor manejo alimentar dessa espécie. É preciso, portanto, intensificar o apoio às pesquisas, para gerar informações capazes de melhorar o desempenho dos cultivos de tambaquis no Estado. A busca por informações sobre densidades de estocagem e suplementação com probióticos bem como o conhecimento do manejo adequado para a produção de tambaqui considerando as características da região de estudo, são importantes para a viabilidade econômica dessa atividade.

2. HIPÓTESES

- A suplementação com probiótico melhora o ganho de peso e o estado imunológico dos tambaquis.
- A suplementação com probiótico pode amenizar os efeitos do adensamento sobre o desenvolvimento dos animais, por promover maior ganho de peso nos peixes.

3. OBJETIVOS

3. 1. GERAL

Analisar os efeitos da suplementação com um probiótico comercial na dieta de juvenis de *C. macropomum* mantidos em duas densidades de estocagem, avaliando parâmetros zootécnicos e hematológicos.

3. 2. ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação com probióticos no desempenho zootécnico dos tambaquis;
- Avaliar o efeito do adensamento no desenvolvimento dos peixes, através da quantificação do arraçamento, biometrias e desempenho zootécnico;
- Avaliar a saúde dos animais através da análise das variáveis hematológicas;
- Avaliar os efeitos do adensamento e da suplementação com probiótico sobre a série vermelha do sangue dos animais.

4. REFERÊNCIAS

- Aliyu-Paiko, M., R. Hashim, e A. C. Shu-Chien. 2010. Influence of dietary lipid/protein ratio on survival, growth, body indices and digestive lipase activity in Snakehead (*Channa striatus*, Bloch 1793) fry reared in re-circulating water system. *Aquaculture Nutrition* 16:466-474.
- Anderson, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 2:281-307.
- Azevedo, R. V. d., J. C. Fosse Filho, S. L. Pereira, L. D. Cardoso, M. V. Vidal Júnior, and D. R. d. Andrade. 2016. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 51:9-16.
- Bajagai, Y. S., A. V. Klieve, P. J. Dart, e W. L. Bryden. 2016. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. FAO, Rome, Italy.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, and J. L. Muzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114:173-186.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, and J. L. Muzquiz. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 19: 239–242.
- Boscolo, W. R., A. Signor, J. Marcela, A. Freitas, e A. Feiden. 2011. Nutrição de peixes nativos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40:145–154.
- Boyd, C. E., and C. S. Tucker. 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Brandão, F. R., L. d. C. Gomes, E. C. Chagas, and L. D. d. Araújo. 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:357-362.
- Bressane, S. B. 2010. Desempenho produtivo de tambaqui - curumim (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) em tanques-rede com diferentes densidades de estocagem no lago Tupé. Monografia. UFAM, Manaus.
- Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8:1137-1144.

- Carnevali, O., L. de Vivo, R. Sulpizio, G. Gioacchini, I. Olivotto, S. Silvi, e A. Cresci. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258:430-438.
- Chagas, E. C., L. C. Gomes, H. Martins Júnior, e R. Roubach. 2007. Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. *Ciência Rural* 37:1109–1115.
- Chagas, E. C., J. N. P. Lourenço, L. C. Gomes, e A. L. Val. 2003. Desempenho e estado de saúde de tambaquis cultivados em tanques-rede sob diferentes densidades de estocagem. Pages 83-93 in E. C. Urbinati and J. E. P. Cyrino, editors. XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. Aquabio, Jaboticabal, SP.
- Cyrino, J. E. P., e D. M. Fracalossi. 2012. Nutriaqua - Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis.
- Cyrino, J. E. P., E. C. Urbinati, D. M. Fracalossi, e N. Castagnolli. 2004. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. TecART, São Paulo.
- Dairiki, J. K. and T. B. A. Silva. 2011. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tambaqui - compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus.
- FAO. 2016. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2014. Rome, Italy.
- Freitas, A.A.; Maciel, E.S; Ktao, H.C.A Percepção do consumo de pescado: Inovação e tecnologia. In:Tavares-Dias, M, W. dos S. M. 2015. Aquicultura no Brasil: novas Perspectivas. (J. R. de M. Brito, Pedro Amaro de Moura & Brito, Ed.). Second edition. São Carlos: Pedro & João Editores.
- Gomes, L. C., R. Roubach, J. N. P. Lourenço, e E. C. Chagas. 2002. Critérios para seleção de local para piscicultura em tanques-rede na Amazônia. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus.
- Gomes, L. d. C., F. R. Brandão, E. C. Chagas, M. F. B. Ferreira, e J. N. d. P. Lourenço. 2004. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. *Acta Amazonica* 34:111-113.
- Gomes, L. d. C., E. C. Chagas, H. Martins-Junior, R. Roubach, E. A. Ono, e J. N. de Paula Lourenço. 2006. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. *Aquaculture* 253:374-384.

- Gonçalves, A. T., M. Maita, K. Futami, M. Endo, e T. Katagiri. 2011. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science* 77:633-642.
- Gross, A., C. E. Boyd, R. T. Lovell, and J. C. Eya. 1998. Phosphorus Budgets for Channel Catfish Ponds Receiving Diets with Different Phosphorus Concentrations. *Journal of the World Aquaculture Society* 29:31-39.
- Gutiérrez, A. F. W., S. G. Contreras, and R. J. Zaldívar. 2012. Efecto de varios niveles de energía digestible y proteína en la dieta sobre el crecimiento de gamitana (*Colossoma macropomum*) Cuvier 1818. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 20:178-186.
- IBAMA. 2007. Estatística da pesca 2007 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- IBGE. 2016. Sistema IBGE de recuperação automática, Produção da aquicultura por tipo de produtos. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Visitado em 17/04/2018.
- Jiang, H.-F., X.-L. Liu, Y.-Q. Chang, M.-T. Liu, and G.-X. Wang. 2013. Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish & Shellfish Immunology* 35:86-91.
- Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173:111-133.
- Lage, V. A., M. E. D. S. G. Pimenta, M. Polo, and L. H. S. Tavares. 1999. Efeito de diferentes densidades de estocagem em níveis de arraçamento no desempenho de piracanjubas (*Brycon orbignyanus*) na fase juvenil. *Revista da Universidade de Alfenas* 5:173-178.
- Lakshmi, B., B. Viswanath, and D. V. R. Sai Gopal. 2013. Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal of Pathogens* 2013:13.
- Lovell, R. T. 1989. Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Mallasen, M., C. Carmo, A. Tucci, H. Barros, N. Eduardo Torres Rojas, F. Fonseca, and E. Yugo Yamashita. 2012. Water quality in cage system fish farm in Ilha Solteira reservoir, SP. *Boletim do Instituto de Pesca* 38:15-30.
- MPA. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.
- NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington D. C., USA.

- Oba-Yoshioka, E. T., R. S. Almeida, S. R. F. Gemaque, A. R. P. Brasiliense, R. D. S. Silva, and G. Barbosa. 2015. Substituição parcial da ração comercial por soja e milho cozidos e sua influência sobre o cultivo de híbridos tambatingas. *Biota Amazônia* 5:61-67.
- Oliveira, A. S. 2012. Caracterização socioambiental da piscicultura em tanques-rede no município de Guapé - MG. Dissertação. Unifenas, Alfenas.
- Oliveira, R. C. 2009. O panorama da aqüicultura no brasil: A prática com foco na sustentabilidade. *Revinter - Revista de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade* 2:71-89.
- Paixao, A. E. M. d., J. C. d. Santos, M. S. Pinto, D. S. P. Pereira, C. Ramos, R. B. Cerqueira, R. D. Navarro, and R. F. d. Silva. 2017. Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International* 25:2035-2045.
- Parron, L. M., H. F. MUNIZ, and C. M. Pereira. 2011. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Embrapa Florestas, Colombo.
- Pedreira, M. M., E. V. Sampaio, J. C. E. Santos, and R. K. Luz. 2010. Cultivo de matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) em tanques-rede, em diferentes densidades de estocagem. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32:17–22.
- Queiroz, J.F. and Rotta, M.A. 2016. Boas Práticas de Manejo para Piscicultura em Tanques-Rede. Circular técnica 26, Embrapa, Jaguariúna, SP.
- Ranzani-Paiva, M. J., S. B. Pádua, M. Tavares-Dias, and M. I. Egami. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá, Paraná.
- Rotta, M. A., and J. F. Queiroz. 2003. Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. Embrapa Pantanal, Corumbá.
- Santos, L., M. Pereira Filho, C. Sobreira, D. Ituassú, and F. A. L. d. Fonseca. 2010a. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. *Acta Amazonica* 40:597-604.
- Santos, M. Q. d. C., C. A. Oishi, M. Pereira Filho, M. d. A. C. Lima, E. A. Ono, and E. G. Affonso. 2010b. Physiological response and performance of tambaqui fed with diets supplemented with Amazonian nut. *Ciência Rural* 40:2181-2185.
- Satake, F., S. B. Pádua, and M. M. Ishikawa. 2009. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. Pages 330-345 in M.

- Tavares-Dias, editor. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa Amapá, Macapá.
- Silva, A. D. R., R. B. Santos, A. M. S. S. Bruno, and E. C. Soares. 2013. Cultivo de tambaqui em canais de abastecimento sob diferentes densidades de peixes. *Acta Amazonica* 43:517-523.
- Silva, C. A., and R. Y. Fujimoto. 2015. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. *Acta Amazonica* 45:323-332.
- Silva, J. A. M. d., M. Pereira-Filho, B. A. S. Cavero, and M. I. d. Oliveira-Pereira. 2007. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). *Acta Amazonica* 37:157-163.
- Turra, E. M., B. M. Queiroz, E. A. Teixeira, P. M. C. Faria, D. V. Crepaldi, and L. P. Ribeiro. 2009. Densidade de estocagem do surubim *Pseudoplatystoma spp* cultivado em tanque-rede. *Revista Brasileira de Produção Animal* 10:177- 187.
- Urbinati, E. C., and P. C. F. Carneiro. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. Pages 171-194 in J. E. P. CYRINO, E. C. URBINATI, D. M. FRACALOSSO, and N. CASTAGNOLLI, editors. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. TecArt, São Paulo.
- Varella, M. B. A., S. N. Peiro, and S. N. Malta. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) (*Osteichthyes: Charidae*) cultivado em tanques rede em um lago de várzea na Amazônia in E. C. Urbinati and J. E. P. Cyrino, editors. Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. Aquabio, Jaboticabal, SP.

ARTIGO CIENTÍFICO

Growth performance and hematological responses of *Colossoma macropomum* juveniles fed probiotics and farmed at two stocking densities

Artigo submetido ao periódico Acta Amazônica

Growth performance and hematological responses of *Colossoma macropomum* juveniles fed probiotics and farmed at two stocking densities

Luiz Alberto SABIONI ¹ *, Eliane Tie Oba YOSHIOKA ²

¹ Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, km 02, CEP 68.903-419, Macapá, Amapá, Brasil.

*luizsabioni@gmail.com

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, nº 2.600, CEP 68.903-419, Macapá, Amapá, Brasil.

Abstract

Tambaqui farming is expanding in Brazil and new technologies need to be produced and implemented in order to achieve production that is more effective and sustainable from the economic and environmental points of view. The objective of the present study was to evaluate the effect of feed supplementation with a commercial probiotic (Lacto-Sacc®), on juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*), at two stocking densities, regarding the following parameters: survival, growth (final weight, final length, weight gain), biomass production (relative biomass gain), feed use (apparent feed conversion, hepatosomatic index, and viscerosomatic index) and hematological parameters (hematocrit, hemoglobin concentration, erythrocyte count, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration and leukocytes respiratory burst activity). Tambaqui (n= 180, approximately 50 g) were distributed into 12 tanks (250 L), at two densities (2.5 kg m⁻³ and 5 kg m⁻³), in an entirely randomized design, with three repetitions. For each density, half of the stocked fish received feed supplemented with probiotics for 30 days, while the other half received non-supplemented feed. Increasing the stocking density did not influence fish survival (P > 0.05), although it caused reductions in growth and feed use in the groups stocked at the highest density. Changing the stocking density and adding probiotic supplementation to the tambaqui's diet did not affected their hematological parameters. Probiotic supplementation caused fish growth when fish were stocked at the lowest density, probably due to better use of dietary nutrients.

Keywords: fish farm, Amazon, weight gain, blood, supplementation.

Introduction

Colossoma macropomum (tambaqui) is the most farmed Brazilian native fish species (Streit Jr. et al. 2012), because of their zootechnical characteristics, such as rapid growth, hardiness, tolerance towards low dissolved oxygen concentration in the water, good acceptance of formulated diets, and good adaptation to the reproduction techniques used in captivity (Silva et al. 2007). This species presents good performance in intensive farming system and has good market value (Val et al. 2000), while meeting the quality standards and prices demanded by consumers. Research's investments are important for developing farming systems that are appropriate for society's needs and the demands of internal and external markets, and for focusing on animal welfare and production sustainability. In intensive fish farming, high stocking densities are used and the optimum density is sought (Silva and Fujimoto 2015). However, these high densities may result in stress for the fish, thus leading to increased energy demand, growth reduction, and low feed consumption, which may cause diseases and result in economic losses (Turra et al. 2009).

Antibiotics have already been used in fish farming as a prophylactic and disease treatment measure. Nevertheless, they have an impact on the microbiota of the aquatic environment, may leave residues in fish flesh and cause resistance among pathogenic microorganisms (Cabello 2006). Consequently, use of microorganisms in fish diets as an immunostimulant has been an alternative for controlling diseases in stocks (Kiron 2012).

Probiotics are living microorganisms that, when administered in adequate amounts, can benefit the hosts' health through improving the microbiota balance in the intestine (Bajagai et al. 2016). Benefits relating to the use of probiotics in aquaculture, such as provision of competitive exclusion of pathogens (Jiang et al. 2013), nutrition source, enzymatic contribution to digestion (Balcázar et al. 2006), increased immune response against pathogens (Balcázar et al. 2004) and antiviral effects (Lakshmi et al. 2013), have already been

described. However, these microorganisms' mechanisms of action have not yet been completely elucidated. Only a few studies have so far evaluated this supplementation at different stocking densities, in relation to zootechnical and hematological parameters. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of a commercial probiotic for dietary supplementation among juvenile tambaquis maintained at two stocking densities, by evaluating zootechnical and hematological parameters.

Material and Methods

The present study was conducted in accordance with the principles pre-established by the Animal Ethics Committee (CEUA) of Embrapa Amapá under the protocol 007-CEUA/CPAFAP of September 20, 2016. Tambaqui fingerlings acquired from a commercial fish farm in the municipality of Macapá, state of Amapá, were transported to the farming warehouse of Embrapa Amapá, also in the municipality of Macapá, state of Amapá. After acclimatization, individuals with an average weight of 50 g were used.

Temperature, dissolved oxygen and pH were monitored every week by using a multiparameter probe (Horiba U-5000, Horiba Instruments Brasil, Ltda, Jundiaí – SP, Brasil) during the experiment period. This resulted in the following mean values: temperature = 29.7 °C (± 1.1); dissolved oxygen = 6.7 mg L⁻¹ (± 1.5); and pH 5.6 (± 2.3). The water quality parameters were kept within a range that was considered ideal for fish farming (Rotta and Queiroz 2003).

Tambaquis (n = 180) were distributed at two different densities (2.5 kg m⁻³ and 5 kg m⁻³) among twelve 250-liter volume capacity tanks, with constant water renewal and aeration. They were acclimatized for approximately 30 days, with daily feeding, four times a day, using commercial extruded feed (Nutripiscis AL 45, 2,8 mm, Presence, Paulínia, SP, Brasil) containing 45% crude protein (CP), at a rate of 4% of the biomass.

To evaluate the effect of supplementation in the tambaqui diet, 5 g of the commercial probiotic Lacto-Sacc (Alltech®, Araucária, PR, Brasil) per kg of feed were added. This product is composed of dry brewer's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*. Fish were maintained at two stocking densities (D1 and D2), with four treatments (Table 1) and three repetitions for each treatment.

The commercial probiotic was incorporated into the feed (commercial ration Nutripiscis TR, 36% CP, 3-4 mm, Presence, Paulínia, SP, Brasil) using soybean oil (20 mL kg⁻¹) in treatments D1P and D2P. Soybean oil (20 mL kg⁻¹) alone was added to the feed of treatments D1 and D2 in order to avoid differences in energy values between the feeds. Approximate chemical composition of diets, in terms of crude protein, lipids (ether extract), dry matter, ashes and fiber were performed. Analyses were done in triplicate, in accordance with guidelines of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

The experimental tanks (12) distribution in the farming warehouse was randomized. The fish were fed four times a day for 30 days, receiving 4% of the tank's biomass as feed.

Growth indices

All fish (n = 180) were weighed using a scale with precision 0.1 g (Knwaagen KN2200/2, Knwaagen, Cotia, SP, Brasil), during distribution in experimental tanks, and at the end of the experiment. Feeds were weighed at the time of supply throughout the period. The following zootechnical performance indices for the fish were calculated from the data obtained: Survival (final number of individuals minus initial number of individuals); Final Weight (g); Final Length (cm); Weight Gain (g) (final mean weight minus initial mean weight); Relative Biomass Gain (RBG, %) [(final biomass / initial biomass) x 100]; and Apparent Feed Conversion (AFC) (total feed consumption / biomass gain).

At the end of the experimental phase (30 days), fifteen individuals from each treatment (five from each tank) were anesthetized using 0.1% benzocaine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), underwent blood sample collection and were euthanized. Their viscera were excised and weighed; their livers were also weighed separately. Through data analysis, the following indexes were obtained: hepatosomatic index (HSI, $\% = \text{liver weight} / \text{animal weight} * 100$), and viscerosomatic index (VSI, $\% = \text{viscera weight} / \text{animal weight} * 100$).

Hematological analysis

Tambaqui blood samples ($n = 60$) were obtained by means of caudal vessel puncture using disposable syringes and hypodermic needles, with sodium heparin anticoagulant (5000 U.I.mL⁻¹). The samples were stored in microtubes and refrigerated. Hematocrit, hemoglobin concentration, erythrocyte counts and leukocytes respiratory burst activity were determined. The hematocrit (%) was obtained through the microhematocrit method, after centrifugation at 12,096 G (Spin 1000, Micro Spin, Jaboticabal, SP, Brasil), and was read using hematocrit reader cards. The hemoglobin concentration was determined using the cyanmethemoglobin method, with Drabkin's reagent, and was read in a spectrophotometer (SP-220, Biospectro, Curitiba, PR, Brasil) at 540 nm, with values expressed in g.dL⁻¹. Finally, erythrocyte counts were conducted in a Neubauer chamber under an optical microscope, using a formaldehyde-citrate solution, expressed as the number of red blood cells/ μL of blood. These data enabled calculation of the following hematimetric indexes: mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) (Ranzani-Paiva et al. 2013). Leukocytes respiratory burst activity was obtained in accordance with the methodology proposed by Anderson and Siwicki (1995), modified by Biller-Takahashi et al. (2013), using 2% NBT (nitro-blue tetrazolium, Sigma-Aldrich, St. Louis,

USA) and DMF (n,n- dimethylformamide, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Absorbance was read in a spectrophotometer (SP-220, Biospectro, Curitiba, Paraná, Brasil) at 540 nm.

Statistical analysis

The data obtained underwent a two-way analysis of variance (ANOVA) in the software SAS 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The homoscedasticity (Brown-Forsythe test) and normality (Cramervon Mises test tests were applied, and this enabled use of Tukey's parametric test (5% probability) to conduct comparisons between the experimental groups.

Results

Neither stocking density nor probiotic addition had any effect regarding tambaqui survival during the farming period evaluated; the survival rate was 100% in all groups tested. Tambaqui from group D1P presented the highest values for final length, final weight and weight gain ($P < 0.05$) among all the experimental groups (Table 2). These tambaquis also presented the highest relative biomass gain value (RBG%), thus showing that although the higher density of the treatment D1P correlated with higher absolute biomass value because of the higher number of individuals, these fish showed higher growth effectiveness. The apparent feed conversion (AFC) showed the effectiveness of food conversion into weight gain among the fish that received the treatment D1P. Moreover, the AFC of treatment D2 was similar ($P > 0.05$) to that of treatment D1P. Hepatosomatic index (HIS, %), and viscerosomatic index (VSI, %) were higher in treatment D2P. This group was also the one that presented the lowest growth performance (Table 2).

Physico-chemical analysis on the feeds (Table 3), with and without probiotic supplementation, showed that use of soybean oil as a vehicle for probiotic supplementation did not alter the protein/lipid relationship. However, the addition of soybean oil did also not

increase the percentage of ether extract, which according to the manufacturer, was at least 7% in the original feed. Thus, the feed can be used for this purpose. Protein concentrations of the feeds used in the experiment were in accordance with the ones recommended by Santos (2010), with 36% CP, for the best performance of the species during this phase. The tambaqui hematological variables did not present alterations regarding density and probiotic supplementation (Table 4). Only leukocyte respiratory burst activity was higher in D2 group than in D1 and D2P groups ($P < 0.05$).

Discussion

The relationship between high stocking density and reduce productive performance among fish may be due to physiological alterations caused by stress, such as energy mobilization and increased parasite incidence (Brandão et al. 2004; Baldwin 2010; Maciel et al. 2013). This may cause losses regarding development and use of food nutrient energy for growth (Tort 2011). It may explain the higher growth and weight gain obtained through using the lower fish stocking density in the present study. However, this effect was observed only in the group that received the commercial probiotic supplementation (D1P) in its diet. Thus, this supplementation led to higher values for weight gain, relative biomass gain, and food conversion among fish that were stocked at lower density, probably due to a better nutrient absorption from the diet provided by probiotics that were present in the digestive tract of the fish.

The effect of use of probiotics in feeding fish is not yet completely understood and different microorganisms present different mechanisms of action (Bajagai et al. 2016). However, several studies have reported beneficial effects from this type of supplementation, such as improvement in nutrient absorption (Carnevali et al. 2006), immunostimulation (Goncalves et al. 2011) and competition with pathogenic agents in the digestive tract (Jiang et

al. 2013). Gonçalves (2011) correlated probiotic supplementation in the diet with a reduction in the stress among the tilapias caused by high stocking densities. However, in the present study, the supplementation used did not favor the fish that were stocked at the higher density (5 kg m^{-3}).

Azevedo et al. (2016) observed higher fish growth, feed consumption and economic parameters through using the probiotic *Bacillus subtilis*. They also observed that the synergistic effects of its association with the mannanoligosaccharide prebiotic originated from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in juvenile tambaquis. In addition, reduction in the growth parameters of the fish stocked at higher densities was observed, but without any effect of supplementation on stocking densities. Paixão (2017) evaluated *Saccharomyces cerevisiae* in tambaquis' diet. However, no alterations in fish zootechnical performance or body composition were observed.

Tambaqui stocked at 2.5 kg m^{-3} that received probiotic supplementation in their diet presented a better AFC index. Thus, group of tambaquis that was stocked at the lower density and received probiotic supplementation in their diet (D1P) showed the same results as the groups stocked at the higher density (D2), from which a better food conversion index was expected (Cruz et al. 2006). AFC is the ratio between ingested quantity of food and gain in biomass and therefore represents the quantity of feed (kg) that is transformed into animal protein (kg). This index helps producers to infer the effectiveness of their farming method and even the economic feasibility of their fish farms. Therefore, it allows producers to determine the optimum time for harvesting, i.e. when the relationship between feed cost and weight gain is most favorable (Azevedo et al. 2016).

Increases in HSI and VSI values may indicate variations in the amount of fat stocked in fish liver, thus enabling inferences regarding their health state (Everaarts et al. 1993), since these parameters indicate fish body condition and nutritional state. HSI of tambaqui from

treatment D2P was significantly highest than other experimental groups, indicating that large accumulation of fat occurred in the liver of this fish group. This reflected negatively on the development of this group and consequently led to lower zootechnical performance. In these tambaquis, higher VSI values were also found, thus indicating that an accumulation of fat also occurred around their viscera, with an indication of weight gain related to an increase in body fat. Glycogen reserves in fish liver and lipid reserves are usually used to produce energy at times of food deprivation, thus sparing the use of proteins for this purpose (Souza et al. 2000). However, this mechanism may vary according to species, sex, and reproductive cycle (Barbieri et al. 1996; Oliveira et al. 1997), and can be also associated with feeding (Tavares-Dias et al. 2000).

Clinical hematology is an important tool for diagnosing pathological conditions that makes it possible to follow up of alterations in blood cells and plasma, which are indicators of such conditions (Satake et al. 2009). It is also used in health studies relating to parasites and bacteria (Ishikawa et al. 2010). This tool can be used as a method for nutritional and immunological evaluations, among others. The results from the present study did not show any differences between the treatments, as also reported by Monteiro et al. (1999) and Bitencourt (2010), who evaluated various stocking densities for *Sparus aurata* and *Piaractus mesopotamicus*, respectively. The same was reported by Lima (2015) who evaluated the use of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* in the diet of *Leporinus macrocephalus*.

However, monitoring these indexes is important for determining patterns for the species and for monitoring the stability of these indexes under various experimental conditions. Increases in the numbers of white and red blood cells in tambaqui that were supplemented with a commercial probiotic containing *S. cerevisiae*, proportional to the length of exposure to the microorganism, were reported by Paixão (2017). This may be an indication that greater

duration of probiotic use in fish diets may lead to alterations in hematological variables in tambaqui.

Leukocytes respiratory burst activity was the only hematological parameter of the tambaquis that was significantly higher ($P < 0.05$) when maintained at higher stocking density. However, burst activity values were not altered, among the tambaquis, through use of a probiotic in their diet. Burst activity is related to the fish immune system because it is a cell defense mechanism that reflects the ability of fish to resist a certain infection (Neumann et al. 2001). Therefore, the presence of the probiotic may stimulate the leukocytes respiratory burst activity, given that contact with microorganisms induces production of this response in defense cells (Iwashita et al. 2015).

Conclusions

The commercial probiotic used in the present study provided higher values for weight gain, relative biomass gain and apparent feed conversion when it was provided at the dose of 5 g/kg of diet for juveniles of tambaqui stocked at the lower density (2.5 kg m^{-3}). This was probably due to the microorganisms increased diet nutrient absorption. We suggest that further studies should be conducted providing the probiotic at different time intervals in order to clarify its effects on the performance and immune system of these fish when farmed at higher stocking densities.

Acknowledgments

The authors thank Embrapa Amapá, Tropical Biodiversity Postgraduate Program of the Federal University of Amapá and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial resources. They also thank Dr. Rafael Sabioni, for support in conducting statistical analysis, and the analyst Leandro Fernandes Damasceno, for support

in conducting bromatological analysis.

References

- Anderson, D.P.; Siwicki, A.K. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.). *Diseases in Asian aquaculture II*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p.185-202.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. AOAC, Arlington, 1141p.
- Azevedo, R.V.; Filho, J.C.F.; Pereira, S.L.; Cardoso, L.D.; Vidal Jr., M.V.; Andrade, D.R. 2016. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51: 9-16.
- Bajagai, Y.S.; Klieve, A.V.; Dart, P.J.; Bryden, W.L. 2016. *Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation*. FAO, Rome, Italy, 180p.
- Balcázar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D.; Muzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
- Balcázar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D.; Muzquiz, J.L. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 19: 239–242.
- Baldwin, L. 2010. The effects of stocking density on fish welfare. *The Plymouth Student Scientist*, 4: 372-383.
- Barbieri, G.; Hartz, S.; Verani, J.R. 1996. O fator de condição e índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, da Represa do Lobo, São Paulo (*Osteichthyes, Characidae*). *Iheringia, Série Zoologia*, 81: 97-100.
- Biller-Takahashi, J.D.; Takahashi, L.S.; Saita, M.V.; Gimbo, R.Y.; Urbinati, E.C. 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73: 425-429.

- Bittencourt, F.; Feiden, A.; Signor, A.A.; Boscolo, W.R.; Lorenz, E.K.; Maluf, M.L.F. 2010. Densidade de estocagem e parâmetros eritrocitários de pacus criados em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 2323-2329.
- Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Araújo, L.D. 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 357-362.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8: 1137-1144.
- Carnevali, O.; de Vivo, L.; Sulpizio, R.; Gioacchini, G.; Olivotto, I.; Silvi, S.; Cresci, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258: 430-438.
- Cruz, A.G.; Melo, A.E.F.; Sobreira, C.B.; Mazeto, M.D.; Naoe, L.K. 2006. *Densidade x Custo de Ração: piscicultura*. SEAGRO-TO / UNITINS, Palmas, 17p.
- Everaarts, J.M.; Shugart, L.R.; Gustin, M.K.; Hawkins, W.E.; Walker, W.W. 1993. Biological markers in fish - dna integrity, hematological parameters and liver somatic index. *Marine Environmental Research*, 35: 101-107.
- Gonçalves, A.T.; Maita, M.; Futami, K.; Endo, M.; Katagiri, T. 2011. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 77: 633-642.
- Ishikawa, M.M.; Pádua, S.B.; Satake, F.; Pietro, P.S.; Hisano, H. 2010. *Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes*. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, 7p.

- Iwashita, M.K.P.; Nakandakare, I.B.; Terhune, J.S.; Wood, T.; Ranzani-Paiva, M.J.T. 2015. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 43: 60-66.
- Jiang, H.-F.; Liu, X.-L.; Chang, Y.-Q.; Liu, M.-T.; Wang, G.-X. 2013. Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 86-91.
- Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173: 111-133.
- Lakshmi, B.; Viswanath, B.; Sai Gopal, D.V.R. 2013. Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal of Pathogens*, 2013: 13.
- Lima, K.S. De; Cipriano, F.D.S.; Oliveira Jr., F.M.D.; Tonini, W.C.T.; Souza, R.H.B.; Simões, I.G.P.C.; Braga, L.G.T. 2015. Performance and hematological variables of piavuçu whose diets were supplemented with phytobiotic and probiotic additives. *Semina: Ciências Agrárias*, 36: 2881-2891.
- Maciel, E.C.S.; Feitosa, K.C.O.; Neto, C.R.C.; Macedo, F.F.; Mattioli, W.O.; Abimorad, E.G.; Abreu, J.S. 2013. 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*, 14: 185-194.
- Montero, D.; Izquierdo, M.S.; Tort, L.; Robaina, L.; Vergara, J.M. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 53-60.

- Neumann, N.F.; Stafford, J.L.; Barreda, D.; Ainsworth, A.J.; Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 807-825.
- Oliveira, E.G.; Urbinati, E.C.; Souza, V.L.; Roviero, D.P. 1997. Concentração de glicogênio em diferentes tecidos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Holmberg, 1887. *Boletim do Instituto de Pesca*, 24: 89-95.
- Paixão, A.E.M.; Santos, J.C.; Pinto, M.S.; Pereira, D.S.P.; Ramos, C.; Cerqueira, R.B.; Navarro, R.D.; Silva, R.F.d. 2017. Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International*, 25: 2035-2045.
- Ranzani-Paiva, M.J.; Pádua, S.B.; Tavares-Dias, M.; Egami, M.I. 2013. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Eduem, Maringá, Paraná, 135p.
- Rotta, M.A.; Queiroz, J.F. 2003. *Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes*. Embrapa Pantanal, Corumbá, 27p.
- Santos, L.; Pereira Filho, M.; Sobreira, C.; Ituassú, D.; Fonseca, F.A.L.d. 2010. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. *Acta Amazonica*, 40: 597-604.
- Satake, F.; Pádua, S.B.; Ishikawa, M.M. 2009. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: Tavares-Dias, M. (Ed.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá, p.330-345.
- Silva, C.A.; Fujimoto, R.Y. 2015. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. *Acta Amazonica*, 45: 323-332.
- Silva, J.A.M.; Pereira-Filho, M.; Cavero, B.A.S.; Oliveira-Pereira, M.I. 2007. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas

- exógenas para juvenis de tambaqui (*Colosssoma macropomum* Cuvier, 1818). *Acta Amazonica*, 37: 157-163.
- Souza, V.L.; Oliveira, E.G.; Urbinati, E.C. 2000. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 15: 371-379.
- Streit Jr., D.P.; Povh, J.A.; Fornari, D.C.; Galo, J.M.; Guerreiro, L.R.J.; Oliveira, D.; Digmayer, M.; Godoy, L.C. 2012. *Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui*. Embrapa Meio Norte, Teresina, 30p.
- Tavares-Dias, M.; Martins, M.L.; Moraes, F.R. 2000. Relação hepatossômica e esplenossômica em peixes teleósteos de cultivo intensivo. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17: 273-281.
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35: 1366-1375.
- Turra, E.M.; Queiroz, B.M.; Teixeira, E.A.; Faria, P.M.C.; Crepaldi, D.V.; Ribeiro, L.P. 2009. Densidade de estocagem do surubim *Pseudoplatystoma* spp cultivado em tanque-rede. *Revista Brasileira de Produção Animal*, 10: 177- 187.
- Val, A.L.; Rolim, P.R.; Rabelo, H. 2000. Situação atual da aquicultura na região norte. In: Valenti, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. (Ed.). *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPq/MCT, Brasília, p.247-266.

Table 1. Experimental groups (D1, D1P, D2, and D2P) of tambaqui *Colossoma macropomum* farmed at two stocking densities (D1 - 2.5 kg m⁻³ and D2 - 5 kg m⁻³) and fed supplemented diet (D1P and D2P - 5 g kg⁻¹ feed) or not supplemented diet (D1 and D2 - 0 g kg⁻¹ feed) with commercial probiotic Lacto-Sacc.

Treatment	D1	D1P	D2	D2P
Stocking densities (kg m ⁻³)	2.5	2.5	5	5
Number of fish for tank	10	10	20	20
Level of supplementation with probiotic	0 g kg ⁻¹ feed	5 g kg ⁻¹ feed	0 g kg ⁻¹ feed	5 g kg ⁻¹ feed

Table 2. Final Weight (g), Final Length (cm), Weight Gain (g), Relative Biomass Gain (RBG, %), Apparent Feed Conversion (AFC), hepatosomatic index (HSI, %), and viscerosomatic index (VSI, %) (Mean ± standard deviation) of tambaqui *Colossoma macropomum*.

Treatment	D1	D1P	D2	D2P
Final Weight	150.31 ± 27.75 ^b	175.04 ± 23.83 ^a	150.61 ± 27.36 ^b	142.46 ± 23.49 ^b
Final Length	20.23 ± 1.23 ^b	21.72 ± 1.08 ^a	20.07 ± 1.18 ^b	20.21 ± 1.16 ^b
Weight Gain	99.33 ± 7.26 ^b	123.03 ± 8.74 ^a	98.14 ± 1.82 ^b	90.83 ± 2.53 ^b
RBG	283.79 ± 4.9 ^b	315.64 ± 0.45 ^a	287.2 ± 2.25 ^b	269.9 ± 5.05 ^c
AFC	0.97 ± 0.04 ^a	0.83 ± 0.05 ^b	0.91 ± 0.01 ^{ab}	0.99 ± 0.02 ^a
HSI	1.55 ± 0.25 ^a	1.62 ± 0.23 ^a	1.49 ± 0.36 ^a	3.39 ± 0.52 ^b
VSI	6.15 ± 1.00 ^{ab}	5.50 ± 0.80 ^b	6.27 ± 1.04 ^{ab}	6.98 ± 0.98 ^a

Different lowercase letters on the same line indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). ANOVA, Tukey *post hoc* test. n=15. . Fish were farmed at two stocking densities (D1, 2.5 kg m⁻³ and D2, 5 kg m⁻³), and fed supplemented diet (5 g kg⁻¹ feed) or not supplemented diet (0 g kg⁻¹ feed) with commercial probiotic Lacto-Sacc.

Table 3. Approximate chemical composition (%) on fresh basis (mean and standard deviation) of commercial diet, with or without commercial probiotic Lacto-Sacc.

	Crude Protein	Ether extract	Dry matter	Ashes	Fiber
With					
commercial	33.70 ± 0.76	3.81 ± 0.31	96.05 ± 0.52	10.11 ± 0.07	3.60 ± 0.35
probiotic					
Without					
commercial	35.66 ± 0.64	4.08 ± 0.27	92.33 ± 5.17	10.12 ± 0.24	3.17 ± 0.08
probiotic					

Table 4. Hemogram parameters of *Colossoma macropomum* fingerlings farmed at two stocking densities (D1, 2.5 kg m⁻³ and D2, 5 kg m⁻³), and fed supplemented diet (5 g kg⁻¹ feed) or not supplemented diet (0 g kg⁻¹ feed) with commercial probiotic Lacto-Sacc. Hematocrit (Ht), hemoglobin concentration (Hb), erythrocyte count (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), leukocytes respiratory burst activity (Burst) (Mean ± standard deviation).

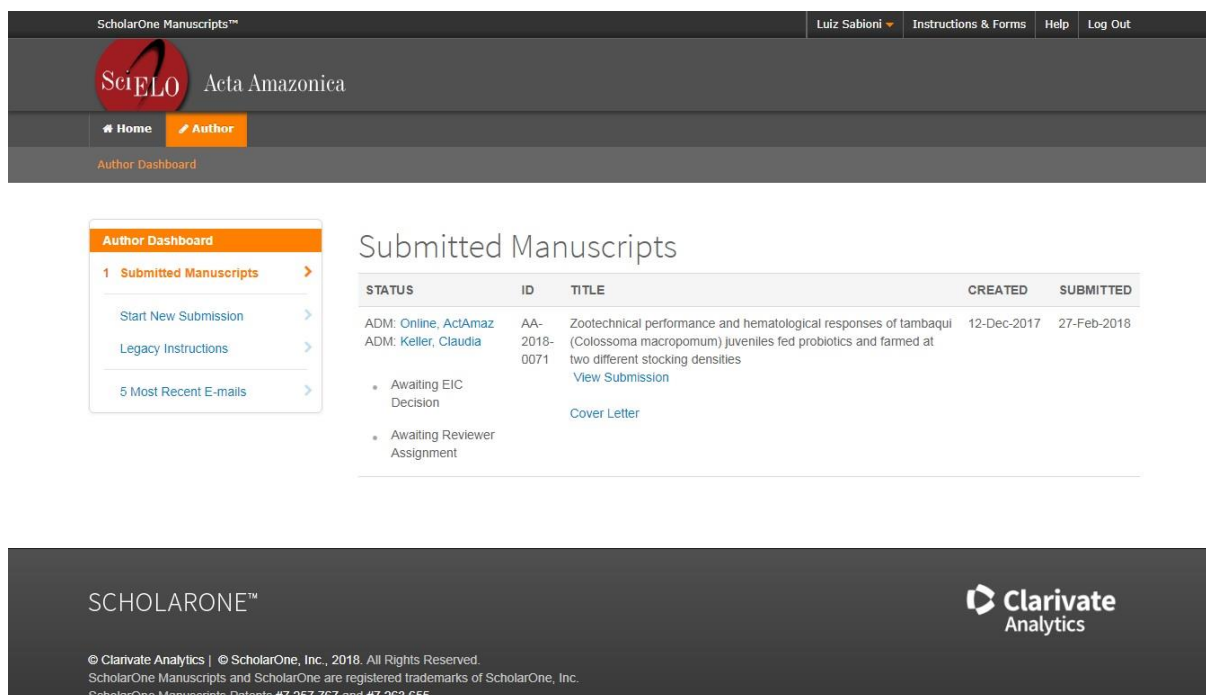
Treatment	D1	D1P	D2	D2P
Ht (%)	28.17±3.67 ^a	24.88 ± 3.79 ^a	26.38 ± 2.91 ^a	25.28 ± 3.69 ^a
Hb (g.dL ⁻¹)	9.82 ± 1.19 ^a	8.74 ± 1.33 ^a	9.16 ± 1.21 ^a	8.79 ± 1.36 ^a
RBC (x 10 ⁶ /μL)	1.42 ± 3.58 ^a	1.28 ± 3.28 ^a	1.23 ± 5.91 ^a	1.22 ± 3.34 ^a
MCV (fL)	207.64 ± 52.66 ^a	206.07 ± 50.40 ^a	177.15 ± 80.48 ^a	199.46 ± 64.60 ^a
MCH (g.dL ⁻¹)	72.02 ± 15.68 ^a	72.81 ± 22.88 ^a	86.86 ± 60.27 ^a	71.12 ± 22.77 ^a

MCHC (g.dL ⁻¹)	35.02 ± 3.02 ^a	34.89 ± 4.76 ^a	34.93 ± 5.58 ^a	34.61 ± 2.96 ^a
Burst (D.O. 540 nm)	0.25 ± 0.06 ^b	0.25 ± 0.05 ^{ab}	0.31 ± 0.06 ^a	0.24 ± 0.07 ^b

Different lowercase letters on the same line indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). ANOVA, Tukey *post hoc* test. n=15. Respiratory burst (optical density at 540 nm).

5. CONCLUSÕES

O probiótico comercial Lacto-Sacc proporcionou maior ganho de peso, ganho relativo de biomassa e conversão alimentar aparente quando fornecido na concentração de 5 g.kg^{-1} de dieta para juvenis de tambaqui estocados na menor densidade (2.5 kg.m^{-3}), provavelmente porque os microrganismos auxiliaram no aumento da absorção e utilização dos nutrientes da dieta. Sugere-se que futuros estudos sejam realizados fornecendo-se o probiótico em diferentes intervalos de tempo, de forma a esclarecer seus efeitos sobre o desempenho e o sistema imune dos peixes quando em densidades de estocagem maiores que 2.5 kg.m^{-3} .



ScholarOne Manuscripts™

Luiz Sabioni ▾ Instructions & Forms Help Log Out

SciELO Acta Amazonica

Home Author

Author Dashboard

Author Dashboard

1 Submitted Manuscripts >

Start New Submission >

Legacy Instructions >

5 Most Recent E-mails >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Online, ActAmaz ADM: Keller, Claudia	AA-2018-0071	Zootechnical performance and hematological responses of tambaqui (Colossoma macropomum) juveniles fed probiotics and farmed at two different stocking densities View Submission Cover Letter	12-Dec-2017	27-Feb-2018

• Awaiting EIC Decision

• Awaiting Reviewer Assignment

SCHOLARONE™

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655

Clarivate Analytics

27-Feb-2018

Dear Mr. Sabioni,

Your manuscript entitled "Zootechnical performance and hematological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles fed probiotics and farmed at two different stocking densities" has been submitted to Acta Amazonica.

Your manuscript ID is AA-2018-0071.

In due time the Editorial Office will inform you the Editor's Decision.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence.

If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aa-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/aa-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Acta Amazonica.

Sincerely,

Acta Amazonica Editorial Office



Zootechnical performance and hematological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles fed probiotics and farmed at two different stocking densities

Journal:	<i>Acta Amazonica</i>
Manuscript ID:	AA-2018-0071
Manuscript Type:	Original Article
Research Area:	Animal and Fisheries Sciences
Keyword:	fish farm, weight gain, hematology, supplementation, Amazon