

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO PROBIÓTICO DO *Bacillus amyloliquefaciens*
NA AEROCISTITE AGUDA EM TILÁPIAS-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

**Thalita Regina Petrillo
Médica Veterinária**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO PROBIÓTICO DO *Bacillus amyloliquefaciens*
NA AEROCISTITE AGUDA EM TILÁPIAS-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Thalita Regina Petrillo

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

2015

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

THALITA REGINA PETRILLO- Natural de São Paulo – SP, nascida em 19 de novembro de 1982. Graduada em Medicina Veterinária em 2009, na Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado – SP. Ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da FCAV-Unesp/Jaboticabal-SP, Patologia Animal, em 2010 tendo concluído em julho de 2012, sob a orientação do Professor Titular, Dr. Flávio Ruas de Moraes. Em agosto de 2012, deu continuidade ao estudo, ingressando no Doutorado em Medicina Veterinária – área de concentração Patologia Animal, Departamento de Patologia Veterinária, nesta mesma instituição de ensino sob a orientação da Professora Doutora Julieta Rodini Engrácia de Moraes.

AGRADECIMENTOS

As minhas primeiras palavras de agradecimento são aos meus pais, Antônio Marcos Petrillo e Marcia Regina de Oliveira. Á vocês, que se doaram inteiros e renunciaram seus sonhos para que muitas vezes pudéssemos realizar os nossos. Sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos possivelmente não estaria aqui.

Aos meus irmãos queridos Thassia Nathalia Petrillo e Tarcio Marcos Petrillo, que me incentivaram, a correr atrás dos meus objetivos sendo além de irmãos amigos, sempre acreditando e me dando forças quando eu já não as tinha agradeço de coração.

Em especial ao meu namorado Luis Gustavo Rossi, obrigada por estar ao meu lado.

Agradeço minha orientadora Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes pela oportunidade e credibilidade, obrigada por tudo, ao nosso eterno mestre Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes.

Aos meus companheiros de pesquisa e trabalho Gustavo Claudiano, Paulo Marcusso, Dayanne Fernandes, Silas Etto, Fausto Marinho, Isabela Mansini, Marina Shimada, Thiago Fernandes, Lygia Malvestio e Jefferson Aguinaga, que auxiliaram durante a execução deste trabalho. O resultado desse estudo foi possível apenas pela cooperação e pelo esforço de todos, levo comigo grandes amigos.

De qualquer forma, todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos. Todos vocês são co-autores deste trabalho.

O percurso foi longo, íngreme, árduo, cansativo, desafiador, e emocionante....

Cada um tem seu lugar guardado na história.

Valeu a pena !!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Probióticos	5
2.1.1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6
2.2. Indutores do processo inflamatório	8
2.2.1. Modelo da bexiga natatória	10
3. OBJETIVO GERAL	12
3.1. Objetivos Específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Instalação dos tanques-rede e acondicionamento dos peixes	13
4.2. Manejo dos peixes	13
4.3. Isolamento e identificação da cepa bacteriana probiótica	14
4.4. Preparo da dieta.....	15
4.5. Parâmetros físicos-químicos da água	15
4.6. Avaliação do desempenho zootécnico	16
4.7. Delineamento experimental.....	16
4.8. Obtenção da <i>Aeromonas hydrophila</i> inativada.....	17
4.9. Anestesia dos peixes	18
4.10. Indução da aerocistite aguda por <i>A. hydrophila</i> inativada	18
4.11. Análise hematológica	19
4.12. Glicose basal.....	19
4.13. Atividade respiratória dos leucócitos – burst oxidativo	20

4.14. Avaliação dos componentes celulares e análise quantitativa do exsudato Inflamatório	20
4.15. Atividade de aglutinação bacteriana	21
4.16. Atividade lítica do soro	22
4.17. Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Parâmetros físicos-químicos da água	23
5.2. Desempenho zootécnico	24
5.3. Análise do perfil hematológico	26
5.4. Glicemia	34
5.5. Atividade respiratória de leucócitos do sangue – burst oxidativo	35
5.6. Avaliação dos componentes celulares e análise quantitativa do exsudato inflamatório	36
5.7. Atividade de aglutinação bacteriana	40
5.8. Atividade lítica do soro	41
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS	49



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 025664/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Efeito probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e resposta inflamatória aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápis-do-Nilo cultivadas em tanque-rede", sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Julieta Rodini Engrácia de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de fevereiro de 2015.

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2015.

Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

EFEITO PROBIÓTICO DO *Bacillus amyloliquefaciens* NA AEROCISTITE AGUDA EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO – A utilização de probióticos surge como uma alternativa, para o uso de antibióticos em peixes, evitando que os mesmos adoeçam. O escopo deste trabalho foi avaliar os efeitos da alimentação adicionada de probiótico contendo *Bacillus amyloliquefaciens* na inflamação aguda contra *A. hydrophila* em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tanto foram utilizados 936 exemplares de tilápias-do-Nilo (30g), distribuídas uniformemente em 12 tanques-rede sendo 78 peixes em cada. Os peixes foram alimentados durante 60 dias com ração adicionada com a bactéria probiótica em diferentes concentrações, sendo constituídos os seguintes grupos; Grupo 1 (controle) alimentado com ração basal sem adição de probiótico; Grupo 2 (T1) suplementados com 0,75 gramas de probiótico/kg de ração; Grupo 3 (T2) suplementados com 1,5 gramas de probiótico/kg de ração; Grupo 4 (T3) suplementados com 3 gramas de probiótico/kg de ração. Para o estímulo inflamatório inoculou-se na bexiga natatória dos peixes 0,5 ml de solução salina 0,65% no grupo controle e 0,5 ml x10⁶ de uma solução, contendo *A. hydrophila* inativada nos demais grupos. As coletas de sangue e exsudato inflamatório foram realizadas nos tempos de 12, 24 e 48 horas após estímulo inflamatório (HPE), para as seguintes análises: variáveis hematológicas, índices de glicose basal, atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos (burst oxidativo), características qualitativas e quantitativas do exsudato, atividade lítica das proteases do soro e atividade de aglutinação bacteriana. Os resultados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey. Não foram observadas variações hematológicas significativas entre os grupos de tilápias-do-Nilo tratadas e estimuladas e o grupo controle, o mesmo pode ser observado nos índices glicêmicos e atividade respiratória de leucócitos do sangue. O exsudato inflamatório foi caracterizado pelo acúmulo predominante de granulócitos seguido de linfócitos em todos os grupos tratados e estimulados quando comparados aos grupos controles ao longo do período experimental. Na análise da atividade lítica do soro dos os grupos tratados e estimulados apresentaram maior capacidade lítica (P <0,05) quando comparados aos grupos nos tempos de (12, 24 e 48 HPE). A atividade de aglutinação bacteriana não apresentou diferenças significativas entre os grupos tratados e estimulados e os grupos controles. Assim os resultados apresentados por este trabalho demonstraram que a alimentação com adição de probiótico contendo *B. amyloliquefaciens* nos grupos tratados e estimulados inferiu em um aumento de granulócitos e linfócitos no sangue e exsudato inflamatório, mas não interferem no desenvolvimento e crescimento das tilápias-do-Nilo criadas em tanques-rede.

Palavras-chave: bactérias probióticas, bacteriose, inflamação, teleósteo.

EFFECT OF PROBIOTIC *Bacillus amyloliquefaciens* IN AEROCISTITE ACUTE IN NILE -TILAPIA (*Oreochromis niloticus*).

ABSTRACT - The use of probiotics arises as an alternative to the use of antibiotics in fishes, preventing them from becoming sick. The scope of this study was to evaluate the effects of food with added probiotic containing *Bacillus amyloliquefaciens* in acute inflammation against *A. hydrophila* in the Nile-tilapia (*Oreochromis niloticus*). To that end, there were used 936 copies of the Nile-tilapia (30g), evenly distributed in 12 net tanks with 78 fish in each. The fishes were fed for 60 days with food added with the probiotic bacteria in different concentrations, with the following groups being formed; Group 1 (control) fed with basal food without added probiotic; Group 2 (T1) supplemented with 0.75 grams of probiotic / kg food; Group 3 (T2) supplemented with 1.5 grams of the probiotic / kg food; Group 4 (T3) supplemented with 3 grams of probiotic / kg food. For the inflammatory stimulus it was inoculated in the swimming bladder of fish 0.5 ml of saline solution 0.65% in the control group and 0.5 ml x10⁶ of a solution containing inactivated *A. hydrophila* in the other groups. Blood collections and inflammatory exudate were held in the periods of 12, 24 and 48 hours after the inflammatory stimulus (HPE), for the following analysis: haematological variables, basal glucose levels, respiratory activity of sanguine leukocytes (oxidative burst), qualitative and quantitative characteristics of the exudate, lytic activity of serum proteases and agglutination bacterial activity. The results were compared using analysis of variance (ANOVA) at 5% probability and the difference between the means was compared by Tukey test. There were no significant hematological changes between the groups of Nile-tilapia treated and stimulated and the control group, the same thing can be observed in glycemic indices and respiratory activity of blood leukocytes. The inflammatory exudate was characterized by the predominant accumulation of granulocytes followed by lymphocytes in all treated and stimulated groups when compared to control groups throughout the experimental period. In the analysis of serum lytic activity of treated and stimulated groups, greater lytic capacity ($P < 0.05$) was detected when compared to groups in the periods of (12, 24 and 48 HPE). Bacterial agglutination activity showed no significant differences between the treated and stimulated groups and the control groups. Thereby, the results presented in this work demonstrated that food with added probiotic containing *B. amyloliquefaciens* in the treated and stimulated groups inferred in an increase of granulocytes and lymphocytes in the blood and inflammatory exudate, but do not interfere with the development and growth of Nile-tilapia raised in net tanks.

Key-words: probiotic bacteria, bacterial disease, inflammation, teleost.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
µl	Microlitros
Abs	Absoluto
CAA	Conversão alimentar aparente
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CL	Controle
CP	Comprimento padrão
CV	Coeficiente de variação
DL	Decilitro
DL50	Dose letal
DMF	Dimetilformamida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIT	Eritrócito
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fatores de angiogênese
G	Gramas
GP	Ganho de peso
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina eosina
HG	Hemoglobina
HPE	Horas após o estímulo
Htc	Hematócrito
IFN	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Kcal	Kilocaloria
Kg	Quilograma
L	Litro
LOG	Logaritmo

LPS	Lipopolissacarídeo
m ³	Metro cúbico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Miligrama
Min	Minutos
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
N	Número
NGF	Fator de crescimento neural
Nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino
PDFG	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF	Peso final
Pr	Probabilidade de significância
RPM	Rotação por minuto
TGF	Fator de transformação de crescimento
TGF-alfa	Fator de transformação de crescimento alfa
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIS	<i>Tris</i> -hidroximetil-amino-metano,
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo trípico de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes concentrações de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> adicionados à dieta basal de tilápias-do-Nilo.	14
Tabela 2. Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos experimentais.	17
Tabela 3 - Valores médios \pm desvio padrão (DP) da variação dos parâmetros físicos e químicos da água no ambiente de cultivo.	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Temperatura da água de cultivo durante o período experimental.....24
- Figura 2 - Valores médios \pm desvio padrão representando índices de desempenho zootécnico de tilápias-do-Nilo alimentadas com ração basal adicionadas de diferentes concentrações do probiótico na ração, entre os meses de Abril a Maio de 2014. PF: Peso final; CP: Comprimento padrão; GP: Ganho de peso; CA: Conversão alimentar aparente.25
- Figura 3 - Valores médios e desvio padrão do número de eritrócito (Erit) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....26
- Figura 4 - Valores médios e desvio padrão do número de hematócrito (Htc) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....27
- Figura 5 - Valores médios e desvio padrão de volume corpuscular médio (VCM), dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....28
- Figura 6 - Valores médios e desvio padrão de hemoglobina (Hg) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....28
- Figura 7 - Valores médios e desvio padrão da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....29

- Figura 8 - Valores médios e desvio padrão de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....29
- Figura 9 - Valores médios e desvio padrão do número de leucócitos totais dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....31
- Figura 10 - Valores médios e desvio padrão do número de granulócitos absoluto (Abs) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....32
- Figura 11 - Valores médios e desvio padrão do número de monócitos absoluto (Abs) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....33
- Figura 12 - Valores médios e desvio padrão do número de linfócitos absoluto (Abs) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....34
- Figura 13 - Valores médios e desvio padrão da glicose basal (mg/dl) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....35
- Figura 14 – Valores médios e desvio padrão pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) da atividade respiratória de leucócitos do sangue (burst-oxidativo) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.....36
- Figura 15 - Valores médios e desvio padrão do número de leucócitos totais presentes na bexiga natatória dos grupos tratados (T1, T2, T3) e

estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.	37
Figura 16 - Valores médios e desvio padrão do número de granulócitos absoluto (Abs) presentes na bexiga natatória dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.	38
Figura 17 - Valores médios e desvio padrão do número de monócitos absoluto (Abs) presentes na bexiga natatória dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.	39
Figura 18 - Valores médios e desvio padrão do número de linfócitos absoluto (Abs) presentes da bexiga natatória de tilápias-do-Nilo dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.	40
Figura 19 - Valores médios e desvio padrão dos títulos de anticorpos naturais (log 2) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.	41
Figura 20 - Valores médios e desvio padrão da atividade lítica do soro UFC/mL dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.	42

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são usados indiscriminadamente na produção aquícola para o tratamento de doenças bacterianas, este fato gera acúmulo à seleção de genes de resistência às drogas, poluição dos corpos d'água e resíduos nos peixes de criação, bem como em populações selvagens localizadas próximas às pisciculturas, colocando em risco a saúde do consumidor principalmente devido aos resíduos dessas drogas, além de atuar como barreira ao comércio internacional (SMITH et al. 1994; CABELLO, 2006).

Dentre as doenças bacterianas que acometem os sistemas de criação aquícola mundial nos últimos anos, destaca-se a infecção por *Aeromonas* spp, sendo a espécie *Aeromonas hydrophila*, um dos principais agentes patogênicos de peixes de água doce, responsável por grandes perdas na produção e comercialização de peixes (VIVEKANANDHAN et al., 2005; ZMYSLOWSKA et al., 2009; COSTA et al., 2010).

A doença causada pelas bactérias *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água, acometendo peixes em condições de estresse. Estas são bactérias tipicamente oportunistas, podendo prejudicar as funções das brânquias, tegumento e intestino dos peixes (MARTINS, 2000).

Assim, tem-se buscado alternativas para o controle e prevenção de doenças bacterianas na aquicultura (SMITH et al. 1994; CABELLO, 2006)

Os probióticos são recomendados como profiláticos na aquicultura em substituição dos antibióticos. Diversos estudos reportam o uso desses organismos na aquicultura. As espécies de bactérias mais comuns na composição de probióticos no uso na aquicultura são: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johonsii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium* spp, *Bacillus subtilis* e *B. toyoi* (CARNEVALI et al., 2006; RODKHUM et al., 2009; OLMOS et al., 2011).

Estudos clínicos sobre o uso de probióticos como suplementos na alimentação em casos de infecções gastrintestinais, demonstram que estirpes específicas selecionadas da microbiota intestinal saudável exibem capacidades anti-patogênicas e anti-inflamatórias (TOLEDO; FERRER; BORQUEZ, 2010).

A maioria das substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* spp, são ativas contra microrganismos gram-positivos, entretanto muitas pesquisas apontam cepas de *B. amyloliquefaciens* com atividade antimicrobiana de amplo espectro (SUTYAK et al., 2008).

Nos sistemas de criação com adição de probióticos, as trocas de água podem ser diminuídas, uma vez que os probióticos atuam na absorção, decomposição da matéria orgânica da água e nos sedimentos, atuando benéficamente na qualidade da mesma (BARKOH; SMITH; SOUTHARD, 2010).

As bactérias probióticas podem aumentar o número total de eritrócitos, leucócitos (linfócitos e monócitos) e a atividade fagocítica em peixes, descritas como efeito imunoestimulante (WELKER; LIM, 2011).

A imunoestimulação de truta arco-íris suplementadas com o probiótico contendo *Lactobacillus rhamnosus*, foi demonstrada pelo aumento significativo da atividade respiratória de leucócitos na segunda semana de alimentação e da atividade fagocítica após 20 a 30 dias de alimentação (NIKOSKELAINEN et al., 2003; PANIGRAHI et al., 2005).

Após estimulação, neutrófilos são capazes de produzir metabolismo oxidativo, não mitocondrial, referido na literatura como burst (surto ou explosão) oxidativo ou respiratório. O “burst respiratório-oxidativo” é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são geradas por mecanismos dependentes da mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos e por mecanismos independentes da MPO. Os estímulos que desencadeiam o “burst respiratório” envolvem variedade de agentes solúveis e particulados, capazes de ativar fagócitos, podendo estar ou não revestidos por proteínas do hospedeiro (opsoninas), tais como imunoglobulinas, formando complexos antígeno-anticorpo (imunocomplexos = IC) e/ou complemento, que podem aumentar o reconhecimento das partículas pelos fagócitos (EL-BENNA et al., 2005).

De acordo com relatos na literatura, diversas espécies de peixes suplementadas com probióticos demonstraram melhora da atividade fagocítica e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos (IRIANTO; AUSTIN, 2003; DÍAZ-ROSALES et al., 2006; SALINAS et al., 2006). ALY et al.

(2008) demonstram aumento da lisozima e da atividade respiratória dos leucócitos em tilápia-do-Nilo suplementada com *B. subtilis* e *Lactobacillus acidophilus*.

As lisozimas são componentes do sistema imune inato, podendo atuar no sistema imune adaptativo. Compreendem grupo diverso de peptídeos catiônicos antimicrobianos conhecidos como PAMs que são moléculas pequenas de 12 a 100 resíduos de aminoácidos, catiônicas e anfipáticas. Possuem importante atividade antimicrobiana além de outras funções na imunidade, tais como a sinalização celular (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

A atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes teleósteos se deve aos diversos tipos de proteínas e enzimas, que atuam no combate às infecções ou na injúria instalada, promovendo hidrólise da parede celular de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas, levando à lise celular, podendo atuar também contra bactérias Gram-negativas. As principais fontes de lisozimas são os monócitos/macrófagos e neutrófilos (MAGNADOTTIR, 2006; URIBE et al., 2011).

O sistema imunológico dos peixes é fisiologicamente semelhante aos outros vertebrados. A imunidade não específica é de fundamental importância para os peixes, além de desempenhar papel importante na ativação da resposta imunológica adquirida (URIBE et al., 2011).

A imunidade celular não específica envolve monócitos e leucócitos granulares, sendo responsáveis por vários processos de resposta imune inata, como: inflamação, fagocitose com células acessórias e citotoxicidade não específica. A resposta humoral não específica é composta por diversas substâncias como lisozima, sistema complemento, interferon, proteína C reativa, transferina e lectina, que são encontradas no muco, soro, e atuam inibindo o crescimento de microrganismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996). Dessa forma, a primeira e importante defesa dos peixes no sistema inato é a barreira física e mecânica decorrente das células epiteliais e da mucosa da pele, possuindo vários parâmetros de defesa como peptídeo antimicrobiano, fatores complementares e imunoglobulinas (MAGNADOTTIR, 2010).

Os processos de aglutinação e inibição de patógenos são dois mecanismos importantes na resposta imune dos peixes teleósteos realizados por moléculas presentes no soro sanguíneo. As imunoglobulinas, possuem maior capacidade de

aglutinação, por possuírem ações específicas aos antígenos, sendo produzidas pelos linfócitos B (SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006).

Kumar et al. (2008) observaram aumento na contagem de monócitos em *Labeo rohita*, alimentado com *Bacillus subtilis* após uma infecção com *A. hydrophila* sugerindo que a dieta suplementada com probióticos pode melhorar a resposta do sistema imune inespecífica do hospedeiro. Do mesmo modo Aly et al. (2008) relataram os efeitos benéficos da suplementação com probióticos para tilápias.

Dessa forma, o desenvolvimento de alternativas, como a suplementação com probióticos para peixes, visando o controle de doenças bacterianas, têm se mostrado uma ferramenta promissora na aquicultura (SHOEMAKER et al., 2010; PRIDGEON; KLESIUS, 2010; BARBOSA et al., 2011; MOURIÑO, 2012; SILVA et al., 2012, MELLO et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Probióticos

O termo probiótico, que significa "para a vida," é derivado do grego "pro" e "bios" (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999). Esse termo foi utilizado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para descrever "substâncias secretadas por um microrganismo que estimula o crescimento de outro".

Parker (1974) definiu como probiótico um "conjunto de organismos e substâncias que contribuem para o balanço adequado da flora gastrointestinal" (PARKER, 1974, citado por GATESOUBE, 1999).

Segundo Fuller (1989), os probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal. Porém a definição clássica de probiótico é dada como o organismo ou substância de origem bacteriana que contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal, favorecendo a resistência às doenças. Outra definição diz que os probióticos são microrganismos naturais do intestino, que após dosagem oral estabilizam e colonizam o trato gastrintestinal, evitando a colonização por microrganismos prejudiciais assegurando melhor utilização dos alimentos (DUPONT, 2001). São capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos positivos para a saúde do indivíduo (SALMINEN et al., 1999; ISOLAURI, 2001; SANDERS, 2003).

Resultados controversos são encontrados na literatura sobre o uso de probióticos, pois sua efetividade depende de fatores como a cepa que está sendo utilizada, viabilidade dos microrganismos no momento a serem agregadas às rações, quantidade de microrganismos empregada, condições de manejo e estresse, além das formas de fabricação e armazenamento do produto (MENTEN; PEDROSO, 2005). Bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu hábitat convencional, cultivadas e/ou liofilizadas. Devido ao processamento para consumo algumas propriedades podem ser perdidas (GHADBAN, 2002).

Os probióticos podem atuar das seguintes formas: competir pelos nutrientes ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas, alterar a composição da

comunidade bacteriana, promovendo melhorias na saúde dos animais, excluir o organismo patogênico por mecanismos de competição, e contribuir com fonte nutricional podendo atuar na digestão enzimática (BALCÁZAR et al., 2006).

A bactéria probiótica deve sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal, como a ação da bile e dos sucos gástrico, pancreático e entérico e promover efeitos benéficos ao hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; GRAJEK et al., 2005).

Bactérias produtoras de ácido láctico são comumente utilizadas nas preparações probióticas. Estas são encontradas em grandes quantidades no intestino de animais saudáveis e não parece afetá-los de maneira adversa (GONZALES, 2004).

Dentre as cepas de bactérias utilizadas como probióticas, na aquicultura destacam-se pertencentes ao gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B.licheniformes* e *B. circulans*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*), bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*). Estas bactérias possuem a capacidade de sobreviver ao longo do trato intestinal, colonizando e alterando a microbiota intestinal, promovendo melhoria no sistema imune desses animais (JATOBÁ et al., 2008; MOURIÑO et al., 2012). A levedura *Saccharomyces* também tem sido utilizada como probiótico, porém, em menor escala, assim como, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (KLAENHAMMER, 2001).

2.1.1. *Bacillus amyloliquefaciens*

De acordo com Welker e Campbell (1967) *Bacillus amyloliquefaciens*, são bastonetes Gram-positivos, móveis por flagelos peritricos, catalase positivos e formadores de esporos. Esta bactéria possui comportamento bioquímico semelhante ao do *Bacillus subtilis*, porém com maior produção de α -amilase e maior percentual molecular das bases Guanina + Citosina do seu DNA. Seu perfil bioquímico se caracteriza por provocar hidrólise do amido, produzir acetimetil carbinol, fermentar carboidratos como glicose, sacarose e lactose com produção de gás, hidrolisar a gelatina e reduzir nitrato a nitrito. A faixa de temperatura para crescimento varia

entre 30 e 40°C. No entanto, são escassos os estudos disponíveis sobre *B. amyloliquefaciens* utilizados como probióticos em organismos aquáticos (CAO et al., 2011).

Recentemente, em ensaio casualizado, utilizando *B. amyloliquefaciens* adicionado ao arraçoamento como probiótico para enguias, *Anguilla anguilla*, infectadas experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*, demonstrou-se que os peixes suplementados com o probiótico apresentaram atividade antagonista contra oito estirpes de *A. hydrophila* patógenas (CAO et al., 2011).

Alterações em parâmetros zootécnicos também foram observadas com a suplementação dietética com probiótico *Bacillus amyloliquefaciens*. O ganho de peso e fator de conversão alimentar em tilápias do Nilo alimentadas com probiótico fora, superior em peixes alimentados com o probiótico. Melhoras nos parâmetros zootécnicos de garoupa (*Epinephelus coioides*) também foram relatados com a suplementação de *Bacillus subtilis* e *Psychrobacter* sp. e no peixe cabeça-de-cobra (*Channa striatus*) que receberam suplementação dietária de probiótico comercial (Efinol[®] L), nutrientes microbianos seleccionados utilizados para neutralizar as condições estressantes de incubadoras e transporte larval e melhorar a saúde e sobrevivência de larvas de animais aquáticos (MANJU et al., 2011; SUN et al., 2011; LIU et al., 2012; RIDHA; AZAD, 2012).

Em outro estudo, a bactéria foi utilizada para melhorar a sobrevivência de larvas de *Litopenaeus vannamei* estimuladas com *Vibrio* spp (LUIS-VILLASEÑOR et al., 2011). No entanto, não há relatos disponíveis para descrever o potencial da bactéria *B. amyloliquefaciens* utilizada como probiótico em peixes teleósteos.

A maioria das substâncias com atividade antimicrobiana produzida por bactérias do gênero *Bacillus* spp. são ativas contra organismos Gram-positivos (SLEPECKY; HEMPHILL, 2006). Entretanto, muitas pesquisas apontam cepas de *B. amyloliquefaciens* com atividade antimicrobiana de espectro amplo.

2.2. Indutores do processo inflamatório

Uma das bactérias utilizadas em modelos experimentais de inflamação são as do gênero *Aeromonas* (BOZZO et al., 2007; CLAUDIANO et al., 2013), consideradas agentes infecciosos cosmopolitas, encontradas em fontes naturais de água, no solo e em animais de água doce (DAVIS et al., 1990).

Bactérias do gênero *Aeromonas*, pertencem à família *Aeromonadaceae*, são bactérias anaeróbicas facultativas, bacilos Gram-negativos, constituindo-se importantes patógenos de peixes (DAVIS et al., 1990). No Brasil, é uma das principais doenças bacterianas que acometem o cultivo de peixes, causando consideráveis perdas na piscicultura (LIN et al., 1999; NAM; JOH, 2007).

As espécies *Aeromonas spp.* secretam proteínas extracelulares, incluindo amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease. Estas proteínas são conhecidas como fatores de virulência que causam doenças em peixes e humanos (NAM; JOH, 2007). Os mecanismos de adesão e invasão dessa bactéria vão desde o mais simples como as paredes de lipopolissacarídeos, as proteínas da membrana externa, produtos extracelulares (hemolisinas) até mecanismos mais complexos como a comunicação bacteriana (JANDA; ABBOTT, 2010).

A *Aeromonas hydrophila* tem como característica a disseminação rápida, podendo induzir quadro septicêmico, por ser Gram-negativa, possuir LPS, o qual é descrito como potente quimiotático de leucócitos e indutores do choque séptico, tanto em mamíferos como em peixes (FREUNDENBERG et al., 1984, NAYAK et al., 2007).

A septicemia causada pela *A. hydrophila* móvel é umas das doenças mais devastadoras em cultivo de espécies aquáticas, provocando altas mortalidades (SCHRADER; HARRIES; DARWISH, 2013).

Algumas espécies são frequentemente acometidas por essa bactéria, como, carpas (*Cyprinus carpio*), enguias (*Anguilla spp.*), catfish (*Ictalurus punctatus*), tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), truta (*Oncorhynchus mykiss*), e alguns outros animais (SASAN et al., 2011).

As lesões de pele acometem geralmente o tecido muscular, podendo apresentar áreas de hemorragia e necrose sendo a disseminação variada, progredindo posteriormente para úlceras. Os sinais clínicos da infecção sistêmica são exoftalmia, abdômen distendido, contendo líquido de aspecto opaco e/ou ligeiramente sanguinolento e presença de petéquias nas vísceras e parede interna da cavidade abdominal, hiperplasia do fígado, baço e rins (KUBITZA; KUBITZA, 2004).

Embora receba notória atenção como importante patógeno de peixes, ela também compõe parte da microflora normal do intestino de peixes saudáveis (CIPRIANO, 2001).

A patogênese bacteriana pode estar associada aos diversos fatores de virulência (VIZZOTTO, 2009). Pesquisadores descreveram, alguns fatores de virulência em *Aeromonas hydrophila*, dentre eles o antígeno-O, a presença de cápsula (MERINO et al., 1996; ZHANG et al., 2002), camada S (DOOLEY; TRUST, 1988), presença de exotoxinas como hemolisinas e enterotoxinas (CHAKRABORTY et al., 1984), presença de exoenzimas como lipases, amilases e proteases (PEMBERTON; KIDD; SCHMIDT, 1997) e presença do sistema de secreção tipo III (SSTT) (YU et al., 2004). A elastase, lipase e flagelos laterais, foram caracterizados como fatores de patogenicidade da *A. hydrophila*, em estudos que visavam caracterizar os fatores de virulência da doença (SEN, 2005).

As proteases causam danos aos tecidos, produzem glicerofosfolípídeo que atua como uma lipase ou fosfolipase, podendo causar lise de eritrócitos por digestão de sua membrana plasmática. As α -hemolisinas possuem efeitos citotóxicos e lise incompleta produzem poros nas membranas celulares, destruindo a célula por ruptura (PEMBERTON et al., 1997).

A aerolisina é um dos principais fatores de virulência da *A. hydrophila*, secretada com um precursor inativo, convertida rapidamente em toxina ativa pela remoção proteolítica de um peptídeo C-terminal, liga-se de células eucarióticas, causando ruptura, destruição da permeabilidade da membrana e lise osmótica (ABRAMI et al., 1998; LAKSHMANAPERUMALSAMY; THAYUMANAVAN; SUBASHKUMAR, 2005)

A patogênese da *A. hydrophila* é multifatorial, possui ampla variação com relação à virulência e enzimas produzidas (YU et al., 2005; COSTA et al., 2010).

2.2.1. Modelo da bexiga natatória

O primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes foi a fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais (METCHNIKOFF, 1893). Posteriormente, alguns autores (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; JENKINS; KLESIUS, 1998) tentaram caracterizar as células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos em diversas espécies de peixes, tempos de observação e modelos experimentais.

Flogógeno é a denominação do agente indutor do processo inflamatório que atua sobre os tecidos e induz a liberação de mediadores, produzindo aumento da permeabilidade vascular, exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007).

A bexiga natatória auxilia na flutuabilidade do peixe e transmissão de sons, e, sendo um órgão tubular, irrigado e oco, é adequada como modelo experimental para estudos de inflamação, pois permite a fácil indução do processo e coleta de exsudato para avaliação, tanto qualitativa como quantitativa. Além disso, a bexiga natatória não contém células inflamatórias residentes, sendo necessária à sua estimulação para que se acumulem, ao contrário da cavidade celomática. Nesse caso, bactérias inativadas ou não, substâncias químicas, e corpos estranhos antigenicamente inertes podem ser usadas como estímulos inflamatórios (ROBERTS, 1981; CLAUDIANO, et.al., 2013).

Diversos estudos constataram estes fenômenos com aplicação de diferentes estímulos flogógenos na bexiga natatória de *Piaractus mesopotamicus*, avaliando-se o acúmulo de leucócitos e trombócitos no local de inflamação (BOZZO et al., 2007; BOZZO et al., 2008; CASTRO et al., 2008) ou pela inoculação de carragenina na bexiga natatória de tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* e pacus, *Piaractus mesopotamicus*, induzindo-se a reação inflamatória, caracterizada por congestão vascular, acúmulo de células mononucleares semelhantes aos trombócitos, raros

granulócitos e edema (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; MARTINS, 2000; MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2008).

Bozzo et al. (2007) avaliaram a composição celular do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória por tioglicolato, *Aeromonas hydrophila* e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli*, 6, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células predominantes no foco inflamado foram os trombócitos, acompanhados em menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos apresentaram quantidades baixas desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo considerado. O mesmo perfil de acúmulo celular no exsudato inflamatório foi observado por Claudiano et al. (2013), onde avaliou a permeabilidade vascular e os componentes de células inflamatórias em aerocistite induzida em pacu, *Piaractus mesopotamicus* através da inoculação de *Aeromonas hydrophila* inativa.

Matushima et al. (1996) analisaram quantitativamente e qualitativamente o exsudato formado através da indução do processo inflamatório local utilizando a carragenina na bexiga natatória de tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) e pacu (*P. mesopotamicus*) (MARTINS et al., 2000).

A injeção de LPS na bexiga natatória de tilápia-do-Nilo causou a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96%) vinte e quatro horas depois da aplicação (ENDO et al., 1997). O acúmulo de granulócitos no exsudato foi relatado por Moraes et al. (2011) em estímulo por *Aeromonas hydrophila* na mesma espécie de teleósteo.

A doença causada pelo complexo *Aeromonas* tem como sinais clínicos septicemia hemorrágica, lesões superficiais, hemorragias locais particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftalmia, distensão abdominal, ascite, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN; AUSTIN, 1987; NOGA, 1995; PAVANELLI et al., 1999). Por estas características, a *A. hydrophila* é utilizada em diversos estudos experimentais de inflamação aguda.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* adicionado na ração basal em diferentes concentrações sobre a aerocistite aguda por *Aeromonas hydrophila* inativada em tilápias-do-Nilo criadas em tanques redes.

3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil hematológico e os índices de glicose sanguínea de tilápias-do-Nilo alimentadas com ração adicionada de diferentes concentrações de probiótico contendo *Bacillus amyloliquefaciens*.
- Avaliar atividade respiratória de leucócitos do sangue, após o estímulo da aerocistite com *Aeromonas hydrophila* inativada em tilápias-do-Nilo alimentadas com ração adicionada de diferentes concentrações de probiótico *Bacillus amyloliquefaciens*.
- Avaliar os componentes celulares sobre o acúmulo de células totais no exsudato inflamatório na bexiga natatória de tilápias-do-Nilo nos tempos pré estabelecidos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo por *A. hydrophila* inativada.
- Avaliar a atividade de aglutinação bacteriana decorrente da ligação de antígeno e anticorpo por agregação visível das partículas, em relação à interação bactéria probiótica *Bacillus amyloliquefaciens* e o estímulo inflamatório *Aeromonas hydrophila* inativada.
- Avaliar a atividade lítica do soro de tilápias-do-Nilo alimentadas com dieta adicionada de diferentes concentrações de *Bacillus amyloliquefaciens* após o estímulo inflamatório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, no Centro de Aquicultura (Caunesp), Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo. De acordo com os princípios éticos adotado pelo Conselho Nacional de

Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA), protocolo n° 025664/14.

4.1. Instalação dos tanques-rede e acondicionamento dos peixes

O sistema de tanques-rede foi instalado na represa, viveiro n°3 do Caunesp, em sistema de 12 tanques (1,5m³), confeccionados em estrutura de ferro, tela de arame (“aço inox, fio 1,5 mm e malha ¾”), assim como as tampas, o sistema de flutuação composto por quatro tambores plásticos (20 L, cada) em cada tanque, fixados nas extremidades, sob pressão. Os tanques-rede foram presos em cordoalha de aço, ligando um ao outro e fixados nas margens do lago.

Os peixes foram acondicionados em tanques-rede, sendo 78 exemplares de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) distribuídos em cada tanque, com peso inicial de (35±5g), masculinizadas e provenientes da mesma desova. Os tanques-rede foram distribuídos em 4 grupos em triplicata em delineamento inteiramente casualizado.

4.2. Manejo dos peixes

Após o transporte para os tanques-rede os peixes foram aclimatados durante 15 dias, para minimizar os efeitos do estresse (ROBERTSON; THOMAS; ARNOLD, 1988).

Durante o período de aclimação os peixes foram alimentados manualmente com ração comercial peletizada (NutriAcqua ® 28% de proteína bruta e 3.600 kcal de energia bruta kg⁻¹), correspondendo a 3% da biomassa, 3 vezes ao dia (7hs, 12hs e 17hs), durante 60 dias. A inclusão do probiótico seguiu a distribuição apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes concentrações de *Bacillus amyloliquefaciens* adicionados à dieta basal de tilápias-do-Nilo.

Grupos experimentais (Concentração de <i>B. amyloliquefaciens</i>)	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	Unidade Formadora de Colônia (UFC)
C – Controle	0
T1 – 0,75g /kg de ração	1×10^6 UFC·g ⁻¹
T2 – 1,5g /kg de ração	5×10^6 UFC·g ⁻¹
T3 – 3 g /kg de ração	1×10^7 UFC·g ⁻¹

Para o ajuste da quantidade da dieta fornecida durante o experimento, foram realizadas biometrias semanais em 10% dos exemplares de cada tanque-rede, com intervalo de sete dias.

4.3. Isolamento e identificação da cepa bacteriana probiótica

O probiótico utilizado é derivado de um produto comercial que contém em sua composição *Bacillus amyloliquefaciens*. Para confirmação da presença desta bactéria no produto, 1,0 g do probiótico liofilizado foi homogeneizando em 99 mL de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4). Desta solução, 1 mL foi transferido para recipiente contendo solução peptonada (4%) (Sigma-Aldrich, MO, USA) para realizações das diluições séricas. De cada diluição, 100 µl da solução foram distribuídos em placas de petri contendo meio de cultura “Trypticase Soy Agar” (TSA). Cada placa foi montada em *Spread plate* em triplicata e incubadas por 24 a 48h em aerobiose a 26°C. As colônias de *Bacillus* sp. foram identificadas observando suas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais (PRIEST et al., 1987). A partir das colônias isoladas foi realizado o sequenciamento do gene 16S rDNA pelo método proposto por Sanger, Niklen e Coulson (1977) (KYAN, 2003). O material foi semeado em placas de Petri e submetido ao sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO – Unesp - Campus Jaboticabal, para posterior análise. O limite fixado para determinação da espécie foi de 98% de similaridade na análise de BLAST, resultando na similaridade de 99% para *Bacillus amyloliquefaciens* (CHEN et al., 2007).

Para quantificação de bactérias probióticas aderidas à ração nos diferentes tratamentos, 1,0 g da dieta preparada com probiótico foi homogeneizada em 99 mL de PBS (pH 7,4). A partir desta solução foram realizadas diluições séricas e 100 µl foram distribuídos em placas de petri com TSA e incubadas como descrito anteriormente. Por fim, foi realizada a quantificação das colônias que apresentaram características morfológicas, bioquímicas e tintoriais compatíveis com *B. amyloliquefaciens*, uma amostra bacteriana de cada tratamento foi submetida novamente a identificação molecular como descrito anteriormente (PRIEST et al., 1987).

4.4. Preparo da dieta

Foi utilizado o probiótico liofilizado contendo *B. amyloquifaciens*, adicionado à ração comercial (NutriAcqua 28%PB, 3600 kcal.kg⁻¹) nas concentrações 0,75, 1,5 e 3 gramas de probiótico/kg de ração. Para conseguir concentrações finais homogêneas de bactérias na dieta e facilitar a adesão do probiótico à ração, a suspensão bacteriana foi adicionada à ração e homogeneizada manualmente com adição de óleo vegetal comercial (4% do peso; 4000 kcal.L⁻¹). Assim, segundo as recomendações de Das et al., (2013), o alimento foi preparado a cada 7 dias para manter o nível ideal de probiótico na ração.

4.5. Parâmetros físicos-químicos da água

Diariamente a temperatura da água e o oxigênio dissolvido foram determinados por meio do aparelho YSI 53 (YSI Company USA). O pH e a condutividade elétrica foram medidos semanalmente com auxílio do aparelho YSI 63 (YSI Company, USA). A transparência da água foi aferida por meio do uso do disco de Secchi, no horário de 11:00 horas, em dias alternados e com incidência de poucas nuvens.

4.6. Avaliação do desempenho zootécnico

O experimento foi realizado de Abril a Maio de 2014. Após 60 dias de alimentação com dieta adicionada com probiótico, os grupos experimentais foram transferidos para o laboratório de Ictiopatologia (Professor Doutor Flávio Ruas de Moraes) no (CPPAR), acondicionados em caixas de fibra de 250L, (n=10) abastecidas com água corrente de poço artesiano com vazão constante e aeração suplementar.

Os animais foram medidos (comprimento padrão) e pesados em balança digital para os cálculos de desempenho:

$$\text{Ganho de Peso} = \text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial(g)}$$

$$\text{Conversão alimentar aparente} = \frac{\text{Consumo de ração (g)}}{\text{Ganho de peso (g)}}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico} = \frac{\text{Ln massa final} - \text{Ln massa inicial} \times 100}{n \text{ de dias}}$$

$$\text{Eficiência Alimentar} = \frac{\text{Ganho de Peso (g)}}{\text{Consumo de ração (g)}} \times 100$$

4.7. Delineamento experimental

Para a avaliação do aerocistite aguda em tilápias-do-Nilo, os peixes receberam o estímulo na bexiga natatória, contendo 0,5 ml de *Aeromonas hydrophila* inativada, após 60 dias de alimentação com ração basal adicionada com a bactéria probiótica *B. amyloliquefaciens*, em diferentes concentrações como representado na Tabela 2.

Foram avaliados dez peixes por tratamento, em três períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório. Os peixes foram redistribuídos nas caixas, constituindo as três repetições dos quatro tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos experimentais.

Grupos experimentais (Número de peixes)	Horas Pós-estímulo		
	12(HPE)	24(HPE)	48(HPE)
CL – Controle	n=10	n=10	n=10
T1 – 0,75g /kg de ração	n=10	n=10	n=10
T2 – 1,5g /kg de ração	n=10	n=10	n=10
T3 – 3 g /kg de ração	n=10	n=10	n=10

4.8. Obtenção da *Aeromonas hydrophila* inativada

A cepa de *A. hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados, que apresentavam lesões compatíveis com aeromonose, proveniente de piscicultura comercial. Para tanto, os animais foram coletados e transportados até o laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Unesp, Jaboticabal (FCAV).

Utilizou-se os meios de culturas TSA (ágar triptona de soja) e TSB (caldo tríptico de soja) para crescimento da bactéria, as colônias características foram semeadas em meios específicos de cultura e realizadas as provas bioquímicas para identificação da espécie bacteriana. Após a obtenção de colônias puras, estas foram mantidas em (TSB) e após 24 horas de incubação, à 30°C, centrifugado a 3.000 rpm /5 min, em centrífuga clínica, desprezando-se o sobrenadante. A massa bacteriana foi diluída em solução salina (0,65%), esterilizada até a obtenção da concentração 3×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. hydrophila*, utilizando-se o grau 4 na escala de MacFarland (CLAUDIANO et al., 2013).

A bactéria foi inativada pelo calor (banho-maria a 40°C, por 30 minutos) e uma alíquota foi semeada em meio TSA para certificação.

4.9. Anestesia dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000, para o estímulo do processo inflamatório. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 70% (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1970).

Para a coleta de material e posterior análise de dados, os peixes foram eutanasiados por imersão em solução aquosa de benzocaina, na proporção de 1:20.000, diluída conforme descrito anteriormente.

4.10. Indução da aerocistite aguda por *A. hydrophila* inativada

Os peixes foram anestesiados como descrito anteriormente, a aplicação do estímulo lesivo foi realizada na região antero mediana, um centímetro do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizada (Volume nominal - 1 ml, graduação - intervalo 0,1 em 0,1 ml com subdivisão 0,01 ml, agulha - 13 x 0,45 mm) para atingir a bexiga natatória e novamente agrupados em delineamento inteiramente casualizado.

Os grupos foram distribuídos de acordo com os tratamentos (diferentes concentrações de probiótico), onde um grupo recebeu 0,5 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% (grupo controle/T1) e os demais grupos (T2, T3 e T4) receberam o mesmo volume contendo o estímulo correspondente a 1×10^6 unidades de unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. hydrophila* inativada pelo calor por 30 minutos em banho-maria a 40°C, constituindo o grupo desafiado, para posterior análise da evolução e resposta do processo inflamatório, nos tempos pré-estabelecidos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo (HPE).

Após esses procedimentos os animais foram devolvidos as caixas de origem, com fluxo contínuo de água.

4.11. Análise hematológica

Alíquotas de sangue total foram destinadas às análises hematológicas (hemograma – incluindo número de eritrócitos; taxa de hematócrito; taxa de hemoglobina; volume corpuscular médio/VCM ($Ht \times 10/Ert$); hemoglobina corpuscular média/HCM ($Hb \times 10/Ert$); concentração de hemoglobina corpuscular média/ CHCM ($Hb \times 100/Ht$) e contagem do número de leucócitos e trombócitos realizadas utilizando-se método direto, em câmara de Newbauer (TAVARES-DIAS et al., 1999).

Para a realização do hematócrito, utilizou-se a técnica de microhematócrito, em tubos capilares com uma das extremidades fechadas e centrifugada por cerca de 5 minutos, em 14000 rpm e comparados com o cartão de leitura para hematócrito. A hemoglobina foi aferida com o método Drabkin, com leitura em espectrofotômetro em frequência de 540 nanômetros (COLLIER, 1944).

Para o diferencial de leucócitos e trombócitos, as extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas de acordo com método descrito por Tavares-Dias e Moraes (2003). A identificação e nomenclatura dos leucócitos seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. (1999).

4.12. Glicose basal

A concentração glicêmica basal e ou glicemia foi determinada com o auxílio do aparelho de glicemia “Accu-chek Active” (KIT Medidor de Glicose – Roche) no momento seguinte a coleta de sangue, 2µl da amostra foi inserida na tira “Accu-Chek Active”, a leitura e medição da amostra foi emitida pelo monitor após 5 segundos.

4.13. Atividade respiratória dos leucócitos – burst oxidativo

A atividade respiratória dos leucócitos do sangue foi realizada pela determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo —Burst oxidativo (ANDERSON; SIWICHI, 1994; BRIDLE et al., 2005).

Para isso, 100 µL de sangue + EDTA foram adicionados em 100 µL de PBS contendo “nitroblue tetrazolium” (NBT, Sigma, ST Luis, MO, USA), na proporção de uma pastilha para 5 mL de solução tampão. Após incubação por 30 minutos, 50 µL desta solução foi adicionada à 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) (CHROMASOL[®] plus, por HPLC, ≥ 99,9%), agitado, centrifugado a 450 rpm por 5 minutos, a densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (UNICO[®] 2100) no comprimento de onda de 540 nm e a leitura realizada em espectrofotômetro (SAHOO; KUMARI; MISHRA, 2005).

Na reação, o corante NBT é reduzido, visto que o DMF promove a lise da membrana celular dos leucócitos e solubiliza os precipitados de material insolúvel no interior do fagócito, denominados grânulos de “formazan” (KLEIN, 1990).

4.14. Avaliação dos componentes celulares e análise quantitativa do exsudato Inflamatório

Para avaliar o componente celular do exsudato, os peixes foram agrupados conforme delineamento apresentado na Tabela 1. A coleta das amostras foi realizada nos tempos pré-estabelecidos de 12, 24 e 48 horas, após o estímulo inflamatório. Para isso, os animais foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína 1:20.000, diluída conforme descrito anteriormente. A bexiga natatória foi lavada cuidadosamente com 1,0 ml de PBS, contendo EDTA a 0,09% o mesmo volume injetado para lavagem foi aspirado, utilizando seringa descartável e acondicionados em microtubos. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada (MiniSpinplus[®]) a 1000 rpm, por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento total foi ressuspensão com a adição de 100 microlitros de água destilada e uma alíquota desse volume foi transferida para

câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz, coradas segundo recomendações de Tavares-Dias e Moraes (2003).

Para a confecção da extensão do exsudato na lâmina, com o objetivo de realizar a contagem diferencial, utilizou-se soro de tilápia e exsudato na proporção de 1:1. Após a completa secagem, a extensão foi corada com Panótico e a contagem diferencial realizada em microscópio de luz no aumento de 1000 e em um total de 100 leucócitos.

4.15. Atividade de aglutinação bacteriana

Inicialmente, foi realizado ensaio prévio para que se estabelecesse o ponto de equivalência na relação dose – resposta entre as quantidades de UFC e soro. Para tanto, foram feitas as diluições em série de 50 µL de soro de cinco tilápias-do-Nilo, volume igual de PBS (pH 7,2) em cada poço, para adição de 50 µL nas diluições pré-estabelecidas de 10^1 ; 10^2 ; 10^3 ; 10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 UFC de *A. hydrophila*. A dose ideal de resposta foi estabelecida como 10^6 UFC.

A atividade de aglutinação bacteriana natural do soro das amostras de todos os grupos foi realizada em placas de microtitulação com fundo em U. Foram feitas duas diluições em série de 50 µL de soro dos peixes, com volume igual de PBS (pH 7,2) em cada poço, para adição de 50 µL da *A. hydrophila* (10^6 UFC), inativada em banho-maria, a 60°C, por 40 min. As placas foram incubadas por 1 h, a 30 °C. Em seguida deixadas “over night”, em 4°C. O título foi calculado como o recíproco da diluição mais elevada de soro, mostrando-se aglutinação completa das células bacterianas por meio de leitura visual das placas comparada ao padrão de sedimentação do poço de controle sem soro, com os padrões de sedimentação dos demais. O título de anticorpos totais foi identificado como a maior diluição em que se pôde observar a aglutinação positiva das bactérias. Os resultados foram expressos no log 2 dos recíprocos dos títulos dos soros (FERNANDES et al., 2015).

4.16. Atividade lítica do soro

Para a padronização do crescimento da cepa bacteriana, um ensaio prévio foi realizado para determinação do fator de diluição correspondente para permitir a contagem de colônias entre 30 e 300 UFC/placa, necessário à confiabilidade das contagens. Para a padronização foram realizadas seis diluições de *A. hydrophila* em água peptona tamponada (10^6 UFC inóculo original, 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000), seguidas, semeadas pelo método de espalhamento em placa de TSA, adicionado com ampicilina (10 mg/L) e incubadas por 24 horas, a 28 °C, com posterior contagem das colônias em contador automático.

Para o ensaio definitivo, foi estabelecida a diluição em 1:100.000 em água peptonada (pH 7,2) da cepa de *A. hydrophila*. As culturas de *A. hydrophila* (10^6 UFC) foram lavadas e preparadas, conforme descrito no item 3.2. Em seguida 50 µL da suspensão de *A. hydrophila* foi acrescido a 50 µL de soro das amostras em microtubos (1,5 ml) e esta mistura foi incubada durante 1 h a 28 °C. Após este procedimento, a suspensão resultante (100 µL) foi semeada pelo método de espalhamento em placa com TSA, adicionado com ampicilina (10 mg/L) e incubadas por 24 horas, a 28 °C. Após o tempo de crescimento, foi realizada a contagem das colônias. Para controle da técnica (Grupo referência), foi utilizada uma suspensão de 50 µL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% e acrescido a 50 µL da suspensão de *A. hydrophila* em microtubos. A seguir, foram realizados os mesmos procedimentos, supra descritos. Os resultados foram expressos em UFC.

4.17. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando encontradas diferenças estatisticamente significativa as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados foram analisados pelo programa "R Statistic" (versão 0.98.1) e apresentados como valor médio \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros físicos-químicos da água

O experimento foi realizado entre os meses de Abril a Maio de 2014. Durante o período experimental, com exceção da temperatura, não foram observadas alterações na qualidade da água que possam ter interferido na alimentação das tilápias-do-Nilo (BOYD; MASSAUT,1990). Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água mensurados nos meses do experimento estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios \pm desvio padrão (DP) da variação dos parâmetros físicos e químicos da água no ambiente de cultivo.

Parâmetros	Média		DP
Temperatura (°C)	25,54	\pm	1,69
Oxigênio (mg/L)	7,32	\pm	0,48
pH	7,50	\pm	0,30
Transparência (cm)	26,00	\pm	2,10

A temperatura da água variou de 23,8°C a 27,2°C, reduzindo gradativamente do início ao fim do experimento (Figura 1). Os demais índices se mantiveram praticamente constantes durante este período.

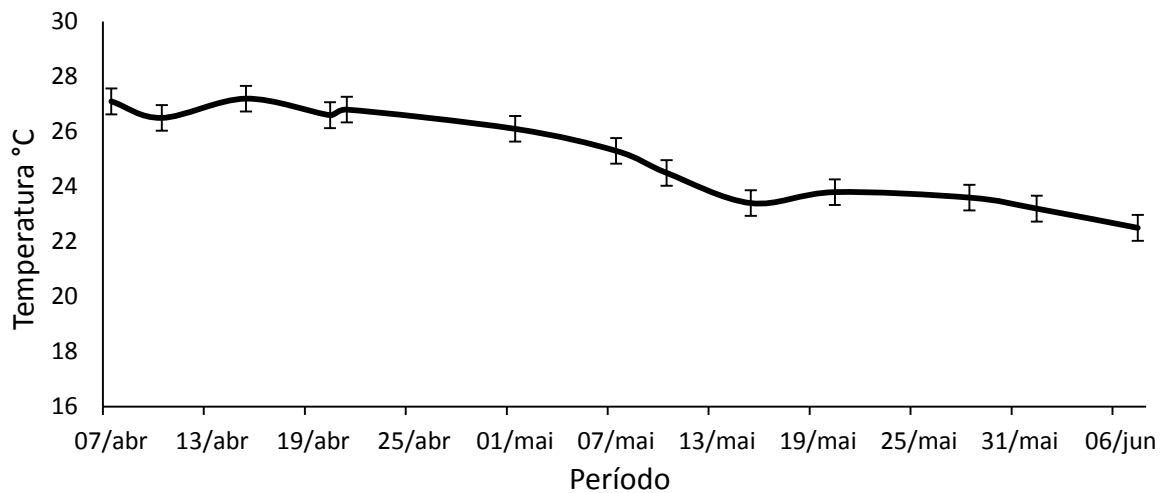


Figura 1 - Temperatura da água de cultivo durante o período experimental.

5.2. Desempenho zootécnico

Observando-se a Figura 2 que mostra os índices zootécnicos, não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações do probiótico (T1, T2 e T3) durante o período de experimentação de 60 dias, quando comparados ao grupo controle (C) alimentados com ração basal sem adição de probiótico. Portanto, nas condições avaliadas, o *B. amyloliquefaciens* não apresentou eficácia no peso final, comprimento padrão, ganho de peso e conversão alimentar aparente para tilápias-do-Nilo (Figura 2).

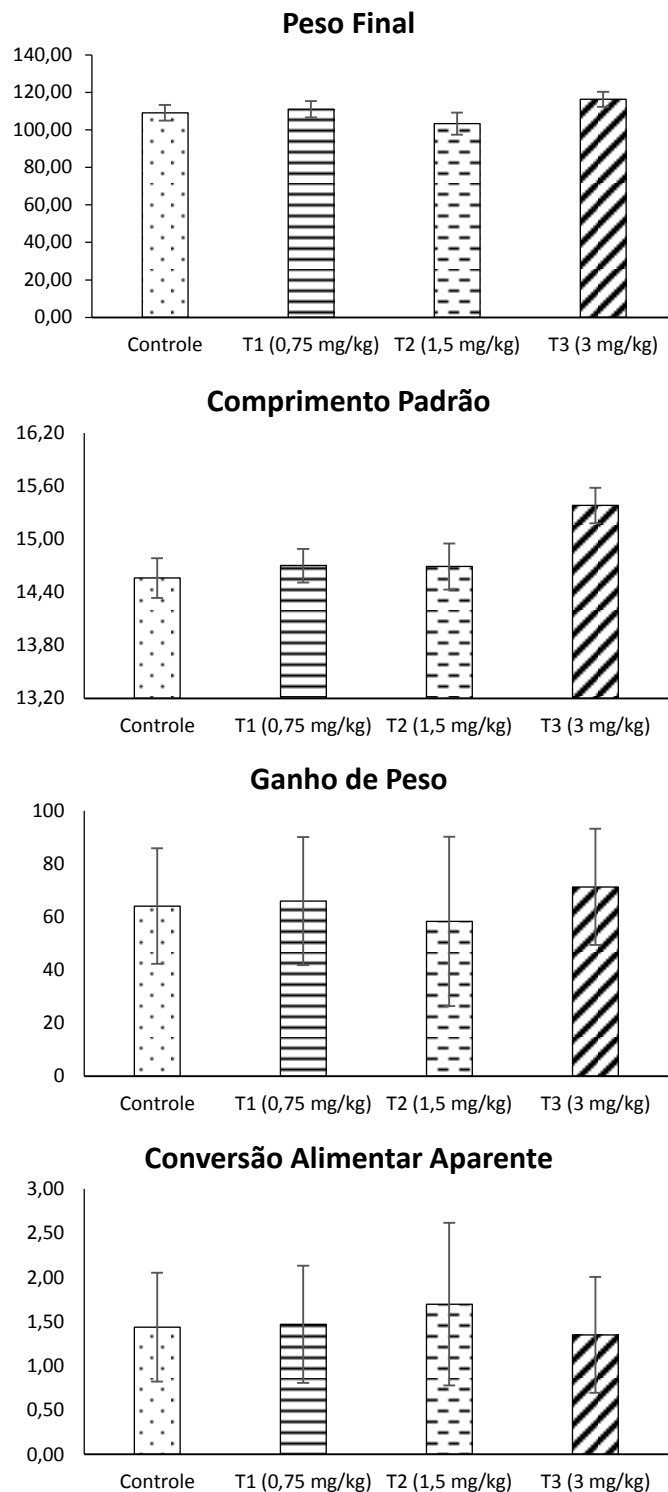


Figura 2 - Valores médios \pm desvio padrão representando índices de desempenho zootécnico de tilápias-do-Nilo alimentadas com ração basal adicionadas de diferentes concentrações do probiótico na ração, entre os meses de Abril a Maio de 2014. PF: Peso final; CP: Comprimento padrão; GP: Ganho de peso; CA: Conversão alimentar aparente.

5.3. Análise do perfil hematológico

De acordo com Figura 3, não foi verificada diferenças significativas ($P>0,05$) na contagem de eritrócitos de tilápias-do-Nilo tratadas e estimuladas (T1, T2 e T3) quando comparadas com tilápias-do-Nilo do grupo controle.

O mesmo pode ser observado durante a evolução do processo inflamatório agudo nos tempos de 12, 24 e 48 HPE.

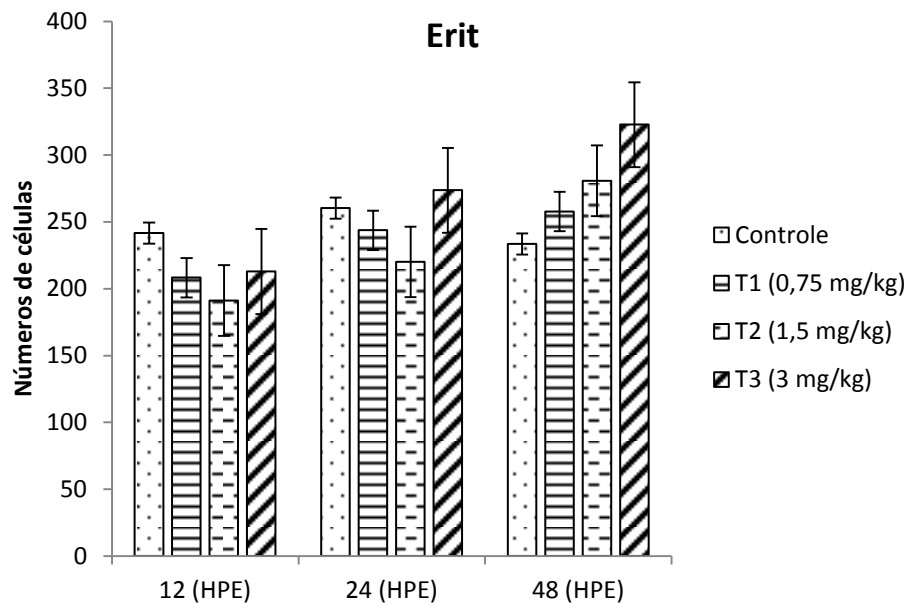


Figura 3 - Valores médios e desvio padrão do número de eritrócito (Erit) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

Os grupos de tilápias-do-Nilo tratadas e estimuladas com *Aeromonas hydrophila* inativada (T1, T2 e T3) não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) no número de hematócrito quando comparadas ao grupo controle (Figura 4).

Na avaliação da evolução da resposta inflamatória de 12, 24 e 48 HPE, todos os grupos tratados e estimulados mantiveram os valores de hematócrito conforme apresentado na Figura 4.

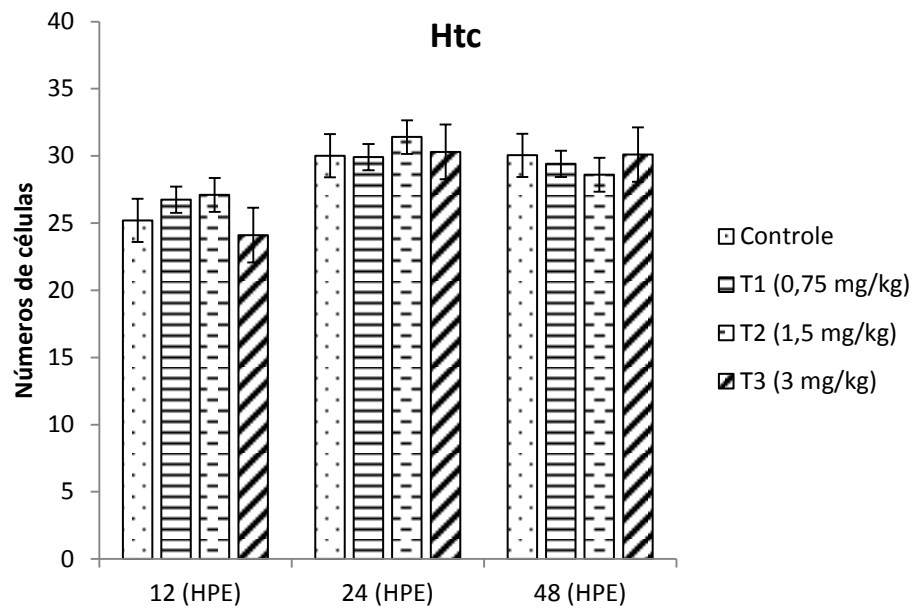


Figura 4 - Valores médios e desvio padrão do número de hematócrito (Htc) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

Durante a evolução do processo inflamatório, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) nos tempos 12, 24 e 48 HPE na contagem global de volume corpuscular médio (VCM) (Figura 5), hemoglobina (Hg) (Figura 6), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Figura 7) e hemoglobina corpuscular média (HCM) (Figura 8).

Sendo observado em todos os grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulados quando comparados ao grupos controles.

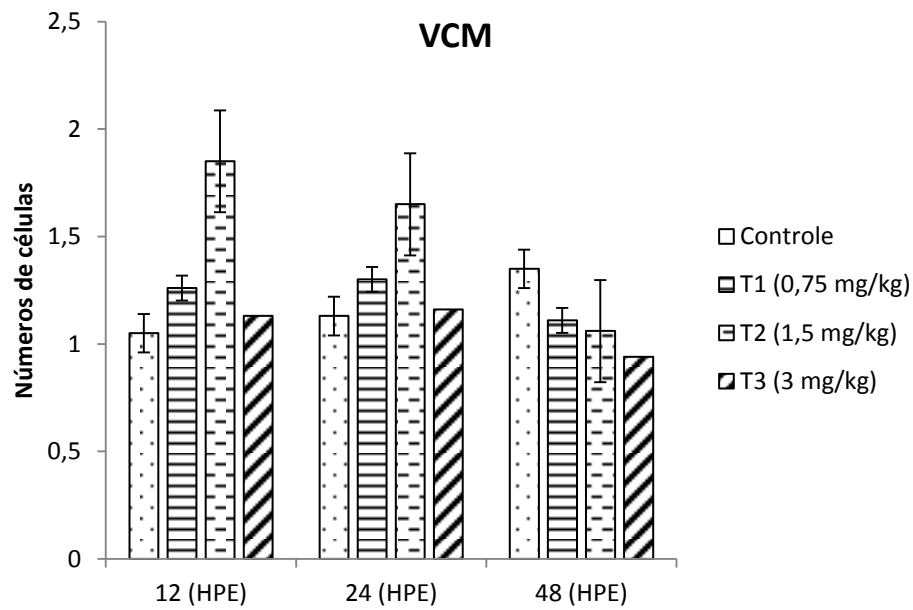


Figura 5 - Valores médios e desvio padrão de volume corpuscular médio (VCM), dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

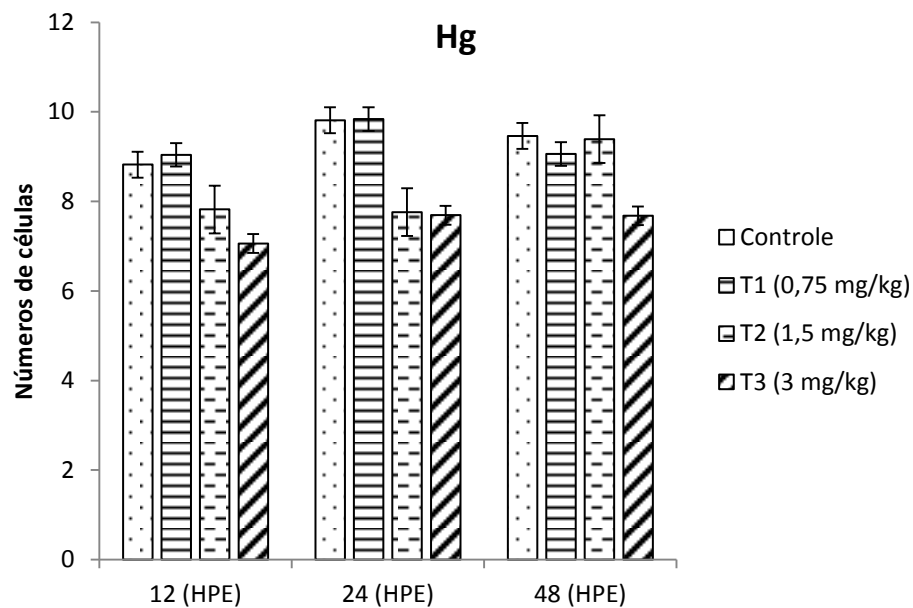


Figura 6 - Valores médios e desvio padrão de hemoglobina (Hg) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

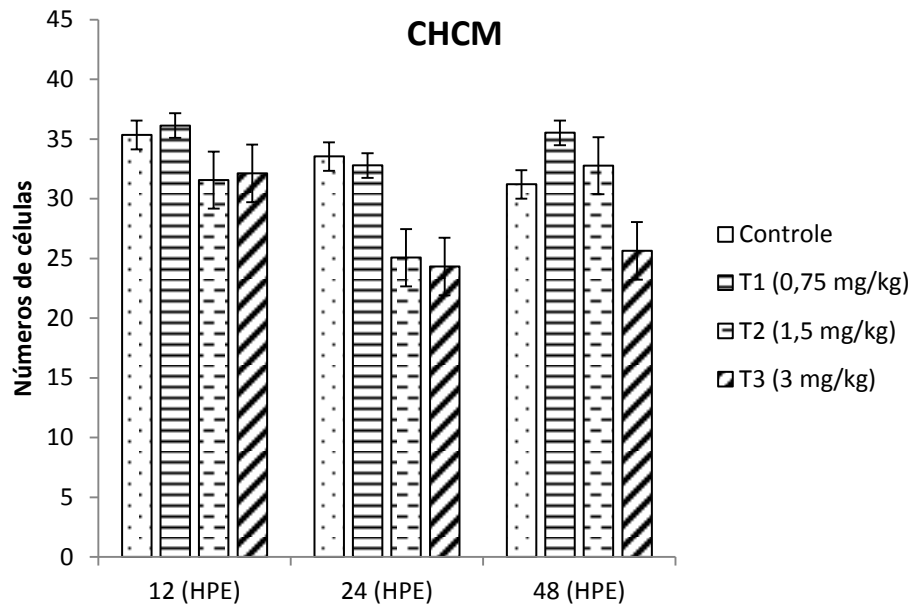


Figura 7 - Valores médios e desvio padrão da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

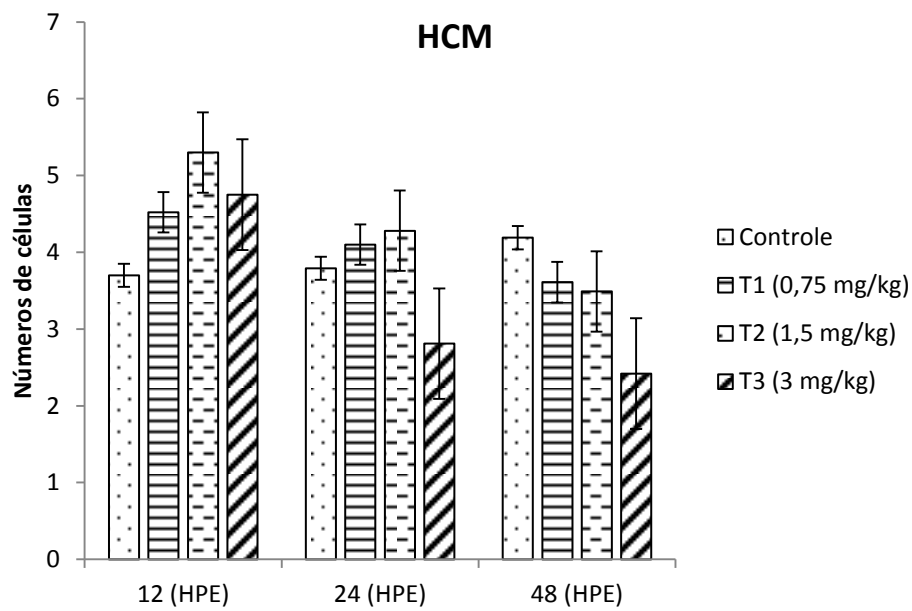


Figura 8 - Valores médios e desvio padrão de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

Na contagem de leucócitos totais 12 horas após o estímulo inflamatório (Figura 9) os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3), apresentaram maior número de leucócitos totais ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

O grupo de tilápias-do-Nilo alimentadas com ração adicionada de *Bacillus amyloliquefaciens* na concentração de 0,75mg/Kg e estimulada com *Aeromonas hydrophila* inativada (T1), apresentou maior acúmulo de leucócitos totais ($P < 0,05$) quando comparadas aos grupos (T2 e T3) 12 após o estímulo inflamatório (Figura 9).

Após 24 horas do estímulo inflamatório observou-se leucocitose ($P < 0,05$) no grupo de tilápias-do-Nilo (T3) quando comparado aos grupos (T1 e T2), o mesmo pode ser observado quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

Durante a evolução da resposta inflamatória aguda, observou-se que 48 horas após o estímulo inflamatório os grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulados apresentaram maior número de leucócitos totais ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (Figura 9), sendo estatisticamente maiores no (T2).

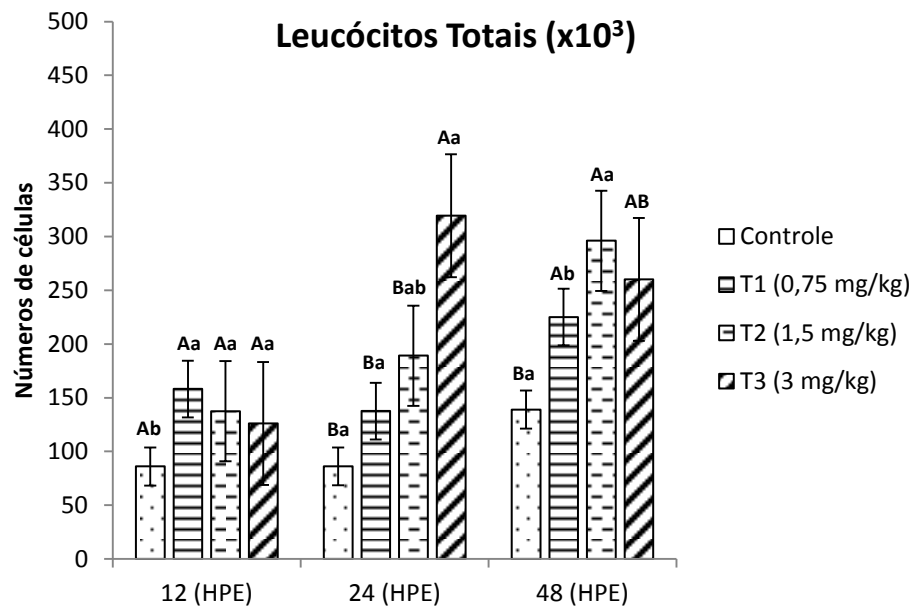


Figura 9 - Valores médios e desvio padrão do número de leucócitos totais dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

No período de 12 horas após o estímulo inflamatório observou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) na contagem de granulócitos Abs (absoluto) nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparadas ao grupo controle (Figura 10).

No tempo de 24 horas após o estímulo inflamatório (Figura 14) observou-se acúmulo significativo ($P < 0,05$) de granulócitos nos grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulados quando comparadas ao grupo controle, sendo maior número de granulócitos observado no grupo (T1 e T3).

Durante a evolução do processo inflamatório 48 HPE, observou-se granulocitose em todos os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparados ao grupo controle, sendo as maiores contagens de granulócitos ($P < 0,05$) observadas no grupo T2 (Figura 10).

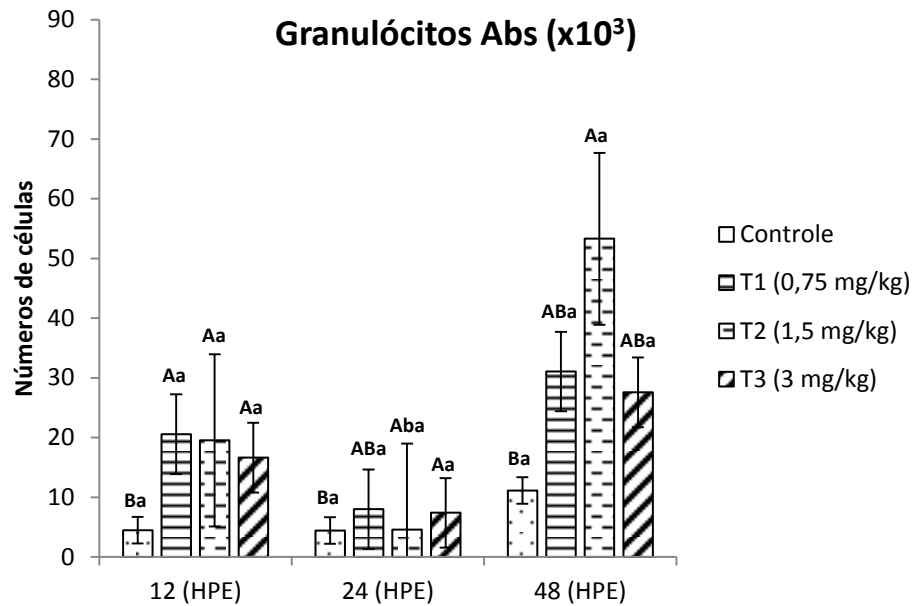


Figura 10 - Valores médios e desvio padrão do número de granulócitos absoluto (Abs) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

Observou-se monocitose ($P < 0.05$) 12 HPE em todos os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3), quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

No período de 24 horas após o estímulo inflamatório o grupo (T3), apresentou maior número de monócitos ($P < 0.05$) quando comparado aos grupos tratados e estimulados (T1 e T2) e grupo controle.

No tempo de 48 HPE inflamatório o grupos tratado (T1) e estimulado não apresentou diferenças significativas ($P < 0.05$) quando comparado ao grupo controle, porem os grupos tratados (T2 e T3) apresentaram menor número de monócitos ($P < 0.05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

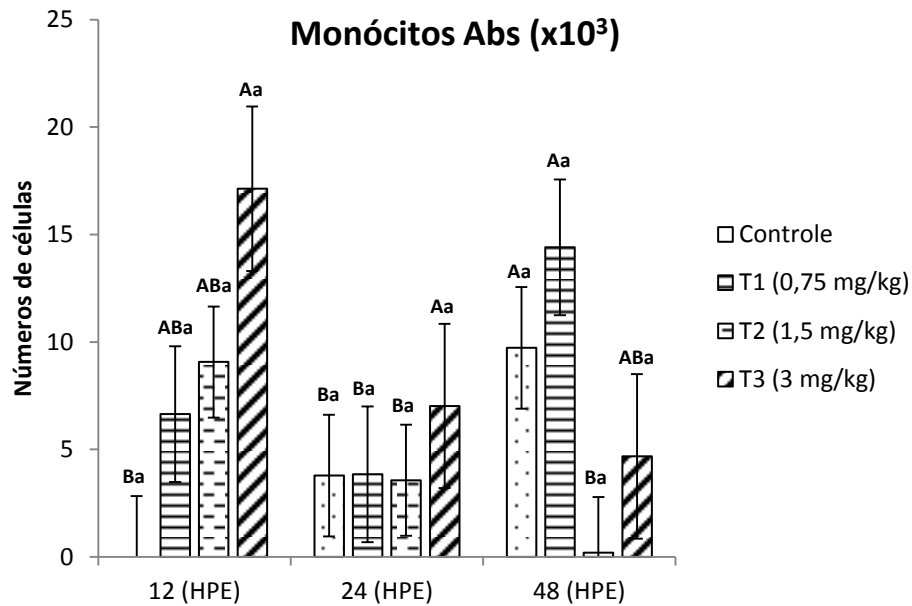


Figura 11 - Valores médios e desvio padrão do número de monócitos absoluto (Abs) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

No período 12 e 48 horas após o estímulo inflamatório não observou-se diferenças significativas ($P < 0.05$) no número de linfócitos nos grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulados quando comparados ao grupo controle (Figura 12).

No tempo de 24 HPE inflamatório observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) do número de linfócitos nos grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulado quando comparados ao grupo controle (Figura 16), sendo estatisticamente maiores no grupo tratado e estimulado (T3).

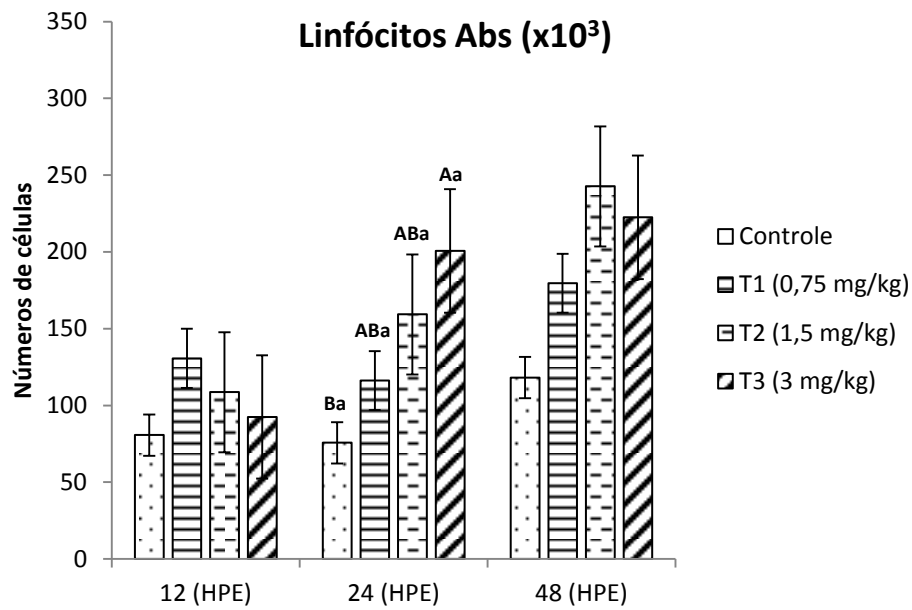


Figura 12 - Valores médios e desvio padrão do número de linfócitos absoluto (Abs) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

5.4. Glicemia

De acordo com os resultados obtidos na análise dos valores de glicose basal de tilápias-do-Nilo os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) nos índices glicêmicos quando comparados aos grupos controles, o mesmo pode ser observado durante a evolução do processo inflamatório nos tempos avaliados de 12, 24 e 48 HPE (Figura 13).

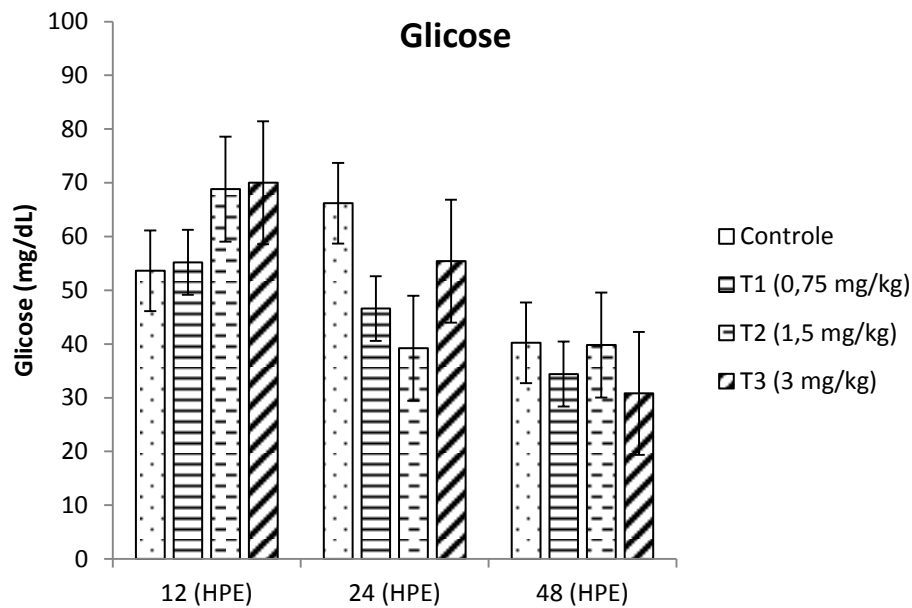


Figura 13 - Valores médios e desvio padrão da glicose basal (mg/dl) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

5.5. Atividade respiratória de leucócitos do sangue – burst oxidativo

Na análise da atividade respiratória de leucócitos do sangue (burst oxidativo), os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas nos tempos avaliados de 12, 24 e 48 horas após o inflamatório nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparado ao controle (Figura 14).

Porem 24 HPE, os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) e grupo controle, apresentaram maior atividade respiratória de leucócitos (Figura 14).

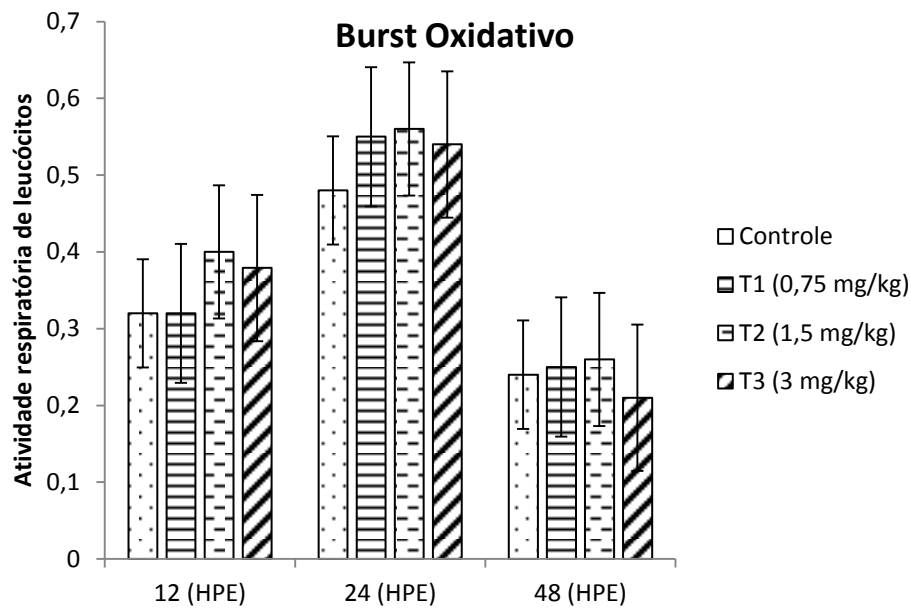


Figura 14 – Valores médios e desvio padrão pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) da atividade respiratória de leucócitos do sangue (burst-oxidativo) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

5.6. Avaliação dos componentes celulares e análise quantitativa do exsudato Inflamatório

Na análise da componente celular do exsudato dos peixes durante a evolução da resposta inflamatória, verificou-se que os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) apresentaram maior acúmulo de leucócitos totais nos tempos de 12, 24 e 48 HPE, quando comparado aos grupos controles (Figura 15).

O acúmulo de leucócitos totais ($P < 0,05$) pode ser observado no período de 24 HPE inflamatório nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3), quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

No período de 48 HPE, os grupos (T1, T2 e T3), mantiveram o mesmo perfil leucocitário. Sendo observado maior número de leucócitos totais nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparado ao grupo controle.

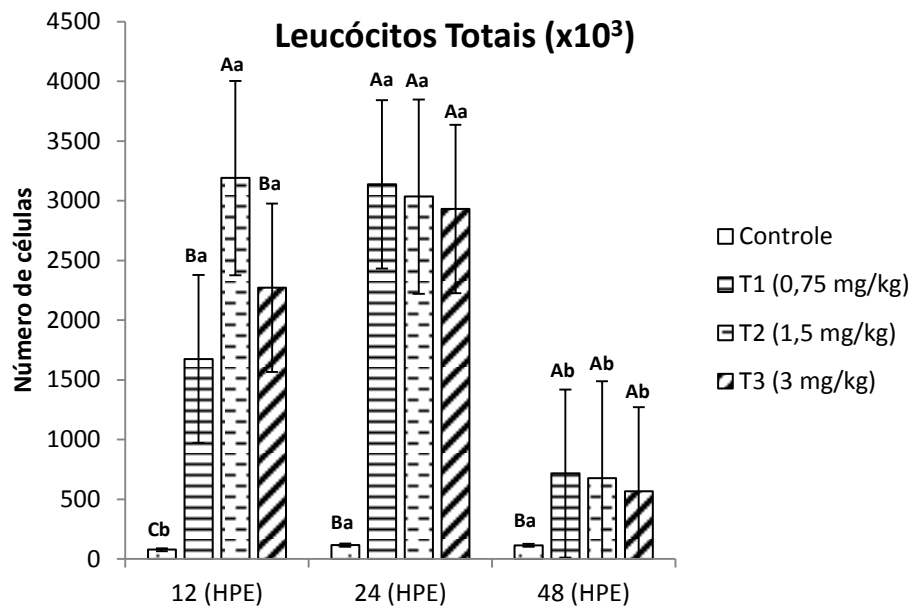


Figura 15 - Valores médios e desvio padrão do número de leucócitos totais presentes na bexiga natatória dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

A contagem de granulócitos foi maior ($P < 0,05$) nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparado ao grupo controle nos tempos avaliados de 12 e 24 HPE inflamatório (Figura 16).

No período de 24 HPE, observou-se diminuição ($P < 0,05$) do número de granulócitos absoluto no exsudato inflamatório no grupo T3 quando comparado aos grupos T1 e T2, representado na Figura 16.

No tempo de 48 horas após estímulo inflamatório observou-se acúmulo significativo ($P < 0,05$) de granulócitos em todos os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparado ao grupo controle.

Na comparação entre os tempos avaliados (12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório) observou-se que os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) apresentaram maior acúmulo de granulócitos (Figura 16).

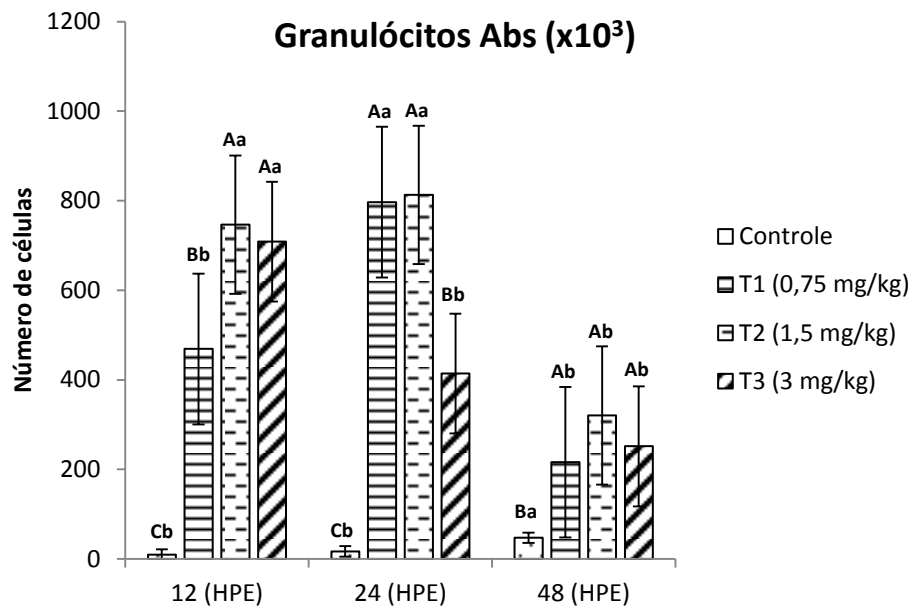


Figura 16 - Valores médios e desvio padrão do número de granulócitos absoluto (Abs) presentes na bexiga natatória dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

O aumento significativo ($P < 0,05$) no número de monócitos absoluto foi observado nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparados ao grupo controle, 12 horas após o estímulo inflamatório, sendo estatisticamente maiores nos grupos tratados e estimulados (T2 e T3) (Figura 17)

No tempo de 24 horas após o estímulo, houve aumento significativo ($P < 0,05$) na contagem de monócitos no exsudato nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) comparados ao grupo controle (Figura 17), sendo mais expressivo no grupo (T1).

Durante a evolução do processo inflamatório (Figura 17), 48 HPE inflamatório, observou-se que todos os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) apresentaram maior número de monócitos ($P < 0,05$) no exsudato quando comparados ao grupo controle, sendo a maior contagem dessas células observada nos grupos (T2 e T3).

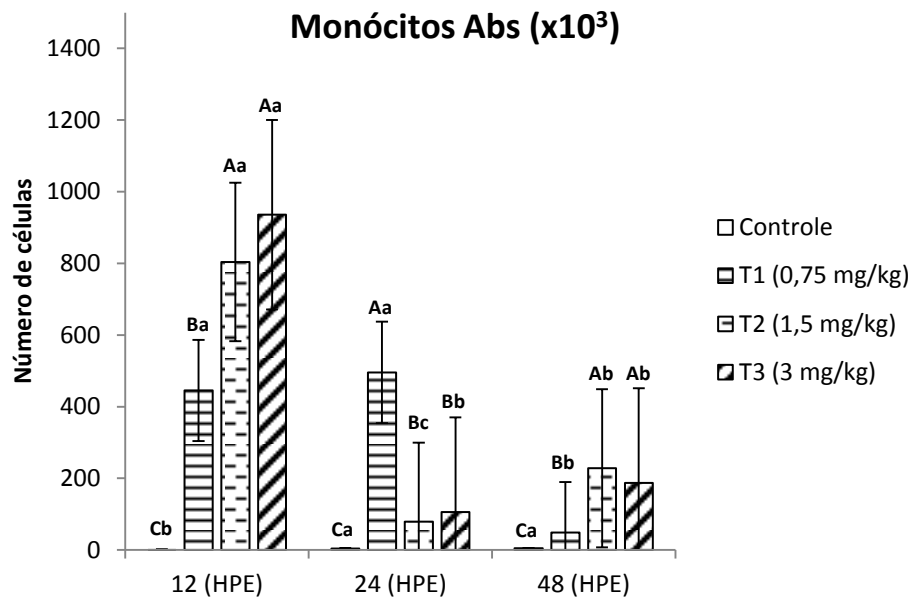


Figura 17 - Valores médios e desvio padrão do número de monócitos absoluto (Abs) presentes na bexiga natatória dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

O acúmulo de linfócitos da bexiga natatória nos grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulados diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) do grupo controle em todos os tempos avaliados (12, 24 e 48) HPE inflamatório (Figura 18).

No período estudado de 12 horas após o estímulo inflamatório (Figura 18), a contagem de linfócitos da bexiga natatória do grupo tratado e estimulado (T2) apresentou maior número de linfócitos, quando comparado ao grupo controle (Figura 18).

Durante a evolução da resposta inflamatória, observou-se aumento no número de linfócitos ($P < 0,05$) em todos os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparados ao grupo controle no período de 24 horas após o estímulo inflamatório.

No período de 48 HPE, (Figura 16) observou-se aumento no número de linfócito ($P < 0,05$) no exsudato nos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparado ao grupo controle, sendo significativamente maiores no grupo (T1).

Na comparação entre os tempos estudados (12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório), (Figura 18), observou-se maior acúmulo de linfócitos ($P < 0,05$) nos grupostratados e estimulados (T1, T2 e T3) quando comparados ao grupo controle, 24 horas após o estímulo inflamatório.

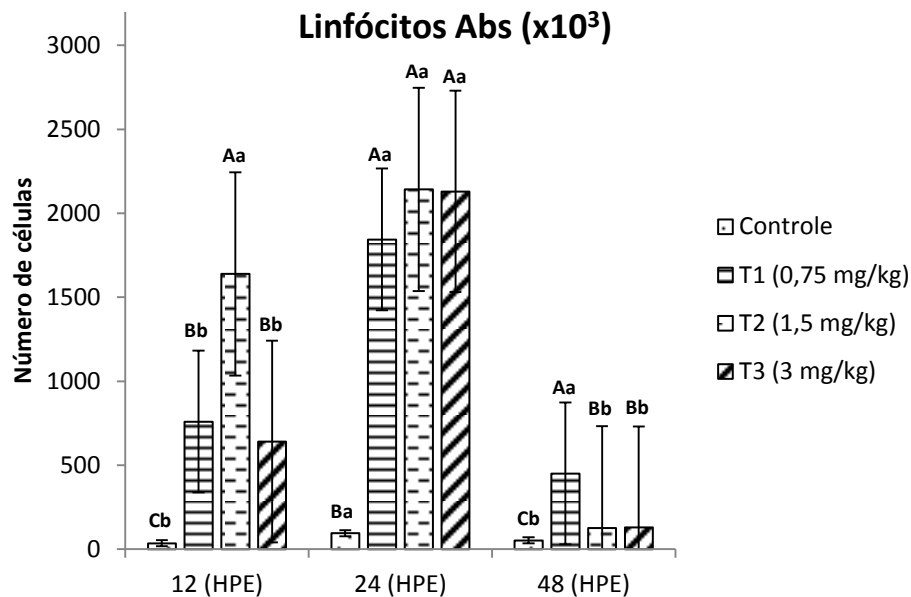


Figura 18 - Valores médios e desvio padrão do número de linfócitos absoluto (Abs) presentes da bexiga natatória de tilápias-do-Nilo dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

5.7. Atividade de aglutinação bacteriana

A Figura 19 expressa o título de aglutinação dos anticorpos do soro de tilápias-do-Nilo contra *A. hydrophila* inativada podendo ser observado que não houve aumento ($P < 0,05$) dos títulos de aglutinação no grupos tratados (T1, T2 e T3) e estimulados quando comparados ao grupo controle, o mesmo pode ser observado ao longo do período experimental nos tempos 12, 24 e HPE.

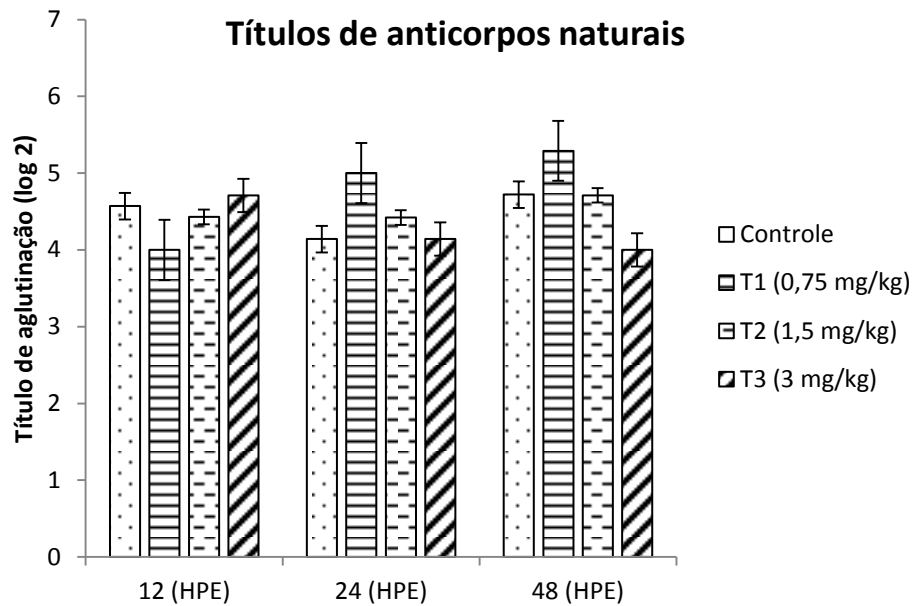


Figura 19 - Valores médios e desvio padrão dos títulos de anticorpos naturais (log 2) dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

5.8. Atividade lítica do soro

No período de 12 HPE, o grupo controle, menor atividade lítica sobre colônias bacterianas quando comparados aos grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) conforme apresentado na Figura 20.

No tempo de 24 HPE, os grupos tratados e estimulados (T1, T2 e T3) apresentaram maior atividade lítica do soro ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle sendo estatisticamente maiores no (T2).

Durante a evolução do processo inflamatório, 48 HPE os grupos tratados e estimulados T1 e T3 apresentaram maior capacidade lítica sobre as colônias bacterianas, diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do grupo controle (Figura 20).

Na avaliação entre os tempos (12, 24 e 48 HPE), a atividade lítica das proteases do soro dos grupos tratados e estimulados T1, T2 e T3 apresentaram maior capacidade lítica sobre as colônias bacterianas 24 horas após o estímulo inflamatório (Figura 20) diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do grupo controle.

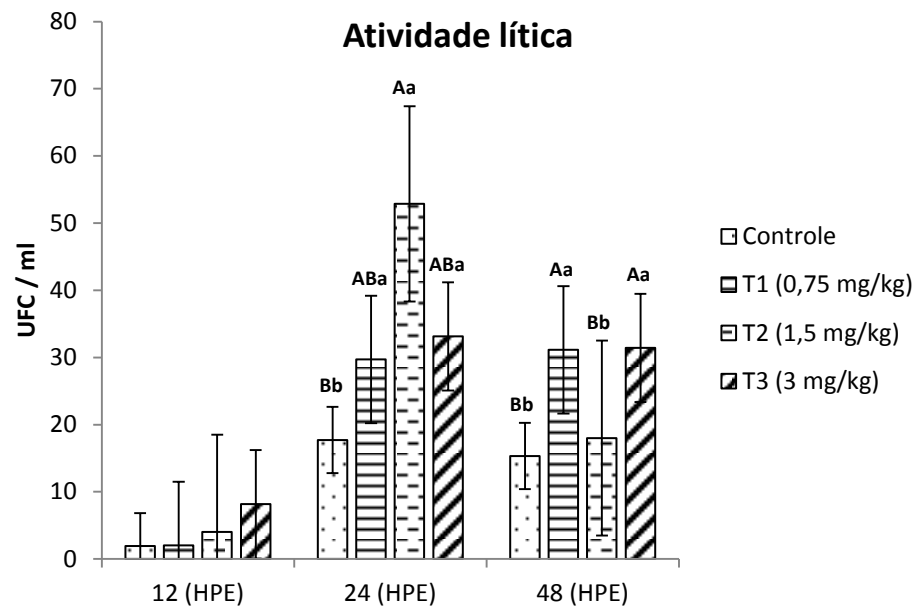


Figura 20 - Valores médios e desvio padrão da atividade lítica do soro UFC/mL dos grupos tratados (T1, T2, T3) e estimulados e grupo controle, avaliados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, não foi observado efeito da bactéria probiótica *B. amyloliquefaciens* sobre os índices zootécnicos avaliados. Em estudos realizados por Ridha e Azad (2012) onde forneceram *B. amyloliquefaciens* (10^8 UFC g^{-1}) para tilápias-do-Nilo por 99 dias também não constataram diferenças significativas nos índices de desempenho em relação aos grupos tratamento e controle. Entretanto, observaram que estendendo o fornecimento da dieta por mais 60 dias, os animais suplementados com *B. amyloliquefaciens* apresentaram melhor desempenho produtivo quando comparados ao grupo controle. Sugerindo que o fornecimento do *B. amyloliquefaciens* melhora o desempenho zootécnico se fornecido por períodos maiores que os realizados no presente ensaio (60 dias). Outras hipóteses que podem estar correlacionadas com a melhora do desempenho zootécnico são a quantidade de probiótico incorporada a ração e características espécie-específicas (DALMO; BOGWALDO, 2008).

Sun et al., (2009) relataram que *Epinephelus coioides* alimentados por 60 dias com *Bacillus* sp. na concentração de (10^8 UFC g^{-1}), não apresentaram efeitos sobre o ganho de peso e taxa de crescimento específico, mas uma melhora significativa na conversão alimentar. Neste trabalho, foram utilizadas concentrações menores (Tabela 1) que podem ter influenciado no desempenho zootécnico de tilápias-do-Nilo criadas em tanques-rede.

Diversos autores relatam melhorias na composição corporal de tilápias-do-Nilo quando sujeitas às dietas suplementadas com outros probióticos, Hassaan et al., (2014) avaliou os efeitos do probiótico *Bacillus licheniformis* em tilápias-do-Nilo. Melo et al. (2013) observou melhoras significativas em tilápias-do-Nilo, alimentadas por 80 dias com probiótico contendo *Bacillus cereus* ($4,0 \times 10^8$ UFC g^{-1}) e *Bacillus subtilis* ($4,0 \times 10^8$ UFC g^{-1}).

Entretanto, neste estudo, os valores da análise da composição corporal não demonstraram diferenças significativas entre os grupos alimentados com ração basal adicionadas de probiótico contendo *B.amyloliquefaciens* em diferentes concentrações quando comparados aos grupos controles.

De acordo com Saulnier (2009) os diferentes mecanismos de ação dos probióticos como melhoria no do sistema imunológico, prevenção de doenças, desempenho do animal e ganho de peso podem ser dependentes da cepa probiótica utilizada, o que torna importante selecionar e comparar cientificamente probióticos, concentrações e os propósitos experimentais pretendidos. Dessa forma pode-se inferir que o probiótico contendo *B.amyloliquefacines* utilizado no presente estudo não apresentou efeitos benéficos nos índices zootécnicos em tilápias-do-Nilo criadas em tanques-rede.

Os parâmetros hematológicos dos peixes são analisados como indicadores do seu estado fisiológico (MOHAPATRA et al., 2014). É reportado em vários estudos que o fornecimento de *Bacillus* sp., pode causar alterações (HASSAAN; SOLTAN; GHONEMY, 2014) ou não (KUMAR et al., 2006; SOLTAN; EL-LAITHY, 2008) nos parâmetros hematológicos em tilápias-do-Nilo.

Os resultados obtidos no presente estudo na análise do eritrograma, os peixes tratados e estimulados comparados ao do grupo controle não apresentaram alterações significativas no eritrograma, pois a ação da bactéria no organismo dos

peixes pode não estar relacionada à hematopoiese, assim como outros autores também relatam em ensaio com diversos *Bacillus* spp utilizados como probióticos HARIKRISHNAN et al (2010).

Merrifield et al. (2010) não encontraram diferenças nestes parâmetros ao suplementar truta arco-íris com *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *Enterococcus faecium* assim como Mourinõ et al. (2012), que não verificaram diferenças no número de eritrócitos em peixes que receberam suplementação com diferentes bactérias probióticas incorporados na dieta.

Nakandakare et al. (2013) em estudo com tilápias de 5,23 cm, utilizando *Bacillus toyoi* e *Bacillus subtilis*, não observaram diferença estatística para Hb, VCM e HCM. Em outros estudos, Merrifield et al. (2010) não encontraram diferenças nos eritrócitos ao suplementar truta arco-íris com *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *Enterococcus faecium*, assim como MOURIÑO et al. (2012).

Assim experimentos com diferentes bactérias probióticas, bem como diferentes dosagens empregadas e aspectos inerentes à fisiologia das espécies de peixes parecem não mostrar respostas no eritrograma. Os dados deste ensaio confirmam os resultados encontrados por Mehrim (2009) que não observou alterações em VCM e CHCM em peixes alimentados com probiótico comercial.

Já os dados referentes ao leucograma demonstram que o acúmulo de leucócitos totais foi observado nos grupos de tratados e estimulados quando comparados aos grupos controles ao longo do período experimental (12, 24 e 48 HPE), tais resultados foram acompanhados de aumento do número de granulócitos, monócitos e linfócitos.

De acordo com autores que avaliaram a evolução da inflamação aguda nos peixes estimulados experimentalmente ou de forma natural, ocorrem neutrofilia e monocitose no sangue e na área afetada (ROBERTS, 1981; SUZUKI; LIDA, 1992), assim como o observado no presente ensaio.

Os valores de leucócitos e linfócitos circulantes, observados no presente ensaio seguiram o mesmo padrão observado por SAKAI (1999) sugerindo que o probiótico contendo *B.amyloliquefacines* incrementou o nível nutricional, influenciando na demanda energética das tilápias-do-Nilo tratadas e estimuladas,

dando maior suporte durante o processo de ativação linfocitária na resposta imune dos peixes (SPRINGER, 1990).

Diversos estudos demonstram que a alimentação suplementada com imunostimulantes pode elevar o número de leucócitos, conforme foi observado em matrinxã, *B. amazonicus*, alimentados com ração suplementada com altas doses de vitamina C (AFFONSO et al., 2007); em pacus, *P. mesopotamicus*, alimentados com ração suplementada vitaminas C e E (SAFI et al., 2006; ANDRADE et al., 2007) e *Saccharomyces cerevisiae* (REQUE et al., 2010; SALVADOR et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente ensaio são semelhantes aos reportados por Irianto e Austin (2002), Kumar et al. (2008) e El-Rhman et al. (2009) ao suplementar tilápias com probióticos contendo espécies de *Pseudomonas* observaram valores maiores de granulócitos, macrófagos e linfócitos quando comparadas as tilápias do grupo controle.

Em relação aos índices glicêmicos avaliados durante este ensaio, verificou-se que os grupos tratados e estimulados não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, mantendo-se constantes ao longo do período experimental.

Tais resultados sugerem que da alimentação com ração adicionada de probiótico contendo *B. amyloliquefaciens* não exerce influência sobre a atividade metabólica (catabolismo e anabolismo) dos animais, não interferindo nos níveis de glicose sanguínea.

No presente estudo, observou-se que atividade respiratória dos leucócitos do sangue nos grupos tratados e estimulados não apresentaram diferenças significativas comparado ao grupo controle.

Como nenhuma diferença estatística na atividade respiratória dos leucócitos foi observada entre os peixes tratados e controle, sugere-se que o probiótico contendo *B. amyloliquefacines* não exerceu efeito sobre esta resposta.

Tais resultados corroboram com Abreu (2006) que avaliou a suplementação com glicano em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) sobre a atividade respiratória de leucócitos e observou que a suplementação não induziu aumento a atividade respiratória de leucócitos.

Diversos autores relatam o aumento na atividade respiratória de leucócitos do sangue de peixes em ensaios com imunoestimulantes e ou bactérias utilizadas como probióticos, indicando uma interação com receptores de membranas dos neutrófilos, monócitos e macrófagos, frente a diversas injúrias experimentais onde o estímulo na produção e consequente aumento da atividade respiratória indicam uma ativação do sistema imune não específico em peixes (SAKAI, 1999; CUESTA et al., 2002).

Na avaliação dos componentes celulares e análise quantitativa do exsudato inflamatório na bexiga natatória de tilápias-do-Nilo, observou-se maior número de leucócitos totais em todos os grupos tratados e estimulados quando comparados aos grupos controles ao longo do período experimental (12, 24 e 48 HPE). Tal fato deve-se ao aumento do número de granulócitos e linfócitos.

Diversos autores relatam a predominância de linfócitos no foco inflamatório, Jorgensen et al. (1993) induziram inflamação em *Salmo salar* com glucana e relataram acúmulo de macrófagos, neutrófilos e a presença de trombócitos no sítio lesado. Bozzo et al. (2007) utilizaram *A. hydrophila* inativada em peixes tropicais (*P. mesopotamicus*) e observaram que as células predominantes 4 horas após o estímulo inflamatório eram trombócitos e linfócitos, sugerindo participação ativa no evento inflamatório agudo em peixes.

O incremento do número de linfócitos no foco inflamatório observado no presente ensaio pode ser explicado por estudos recentes, que apontam células clássicas da resposta imune adquirida como os linfócitos B, especializados na memória imunológica antigênica, participando da fagocitose de agentes bacterianos exercendo papel importante no início da resposta inflamatória de teleostes (LI et al., 2006; OVERLAND et al., 2010).

Segundo Nayak (2010) a utilização de substâncias orgânicas na alimentação pode modular o sistema imune inato de peixes. Tais substâncias estimulam a atividade fagocítica, o complemento, a concentração de lisozima, atividade respiratória bem como a expressão de várias citocinas em peixes. Embora o mecanismo de ação ainda não esteja esclarecido em nenhuma espécie animal, incluindo os peixes, elas podem ativar ou não funções diferentes na atividade imunomoduladora de cada espécie. Sendo dependente de fatores como fonte, tipo de alimentação, dose e tempo de suplementação.

Tilápias-do-Nilo alimentadas com dieta contendo levedura e vacinadas contra *S. agalactiae* também apresentaram maior número de linfócitos e granulócitos. Este efeito positivo entre os fatores (vacinação e suplementação) foi verificado por Salvador (2008). O autor atribui esses resultados a hipótese de que substâncias dietas imunoestimulantes atuem na melhora do patamar homeostático.

Desta forma, substâncias que promovem uma melhoria da homeostasia, podem favorecer a resposta inflamatória de modo a tornar mais eficientes as defesas contra patógenos (MORAES; MORAES, 2009). Como relatam alguns autores após o uso de dieta suplementada com vitamina C (PETRIC et al., 2003; MORAES et al., 2003; BRUM, 2003), vitamina E (BELO, 2002), parede celular de levedura ou levedura íntegra e autolisada (REQUE, 2005), ácidos graxos essenciais (SAKABE, 2007).

Os resultados observados na atividade lítica no soro de tilápias-do-Nilo tratadas e estimuladas apresentaram diferenças significativas 24 horas após o estímulo inflamatório e 48 horas nos tratamentos T1 e T3. O aumento na lise de bactérias pode ser decorrente do aumento da quantidade de grânulos liberados por granulócitos durante a resposta inflamatória (URIBE et al., 2011). No presente estudo observou-se aumento de granulócitos nos mesmos períodos do aumento da atividade lítica, sugerindo que os dados podem estar correlacionados.

A atividade lítica também pode aumentar em decorrência da ativação do sistema complemento pelas vias alternativa e clássica, levando ao aumento do número de linfócitos, que também foi observado (HOLLAND; LAMBRIS, 2002).

Não foi verificada alterações significativas na atividade de aglutinação bacteriana nos grupos de tilápias-do-Nilo tratadas e estimuladas (12, 24 e 48 HPE) quando comparadas ao grupo controle.

Segundo Fernandes et al. (2015) a aglutinação bacteriana só apresenta positividade 21 dias pós estímulo. Talvez esse seja o período mínimo necessário para que a espécie realize a expansão clonal de linfócitos e produza anticorpos suficientes para que a aglutinação seja detectada, por se tratar de uma técnica altamente específica, mas pouco sensível.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a adição do probiótico contendo *B. Amyloliquefaciens* à ração, independente da concentração fornecida por 60 dias para tilápias-do-Nilo criadas em tanques redes e estimuladas com *Aeromonas hydrophila* inativada proporcionou o aumento do número de leucócitos por aumento de granulócitos e linfócitos no sangue e exsudato, comparado ao grupo controle.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAMI, L.; FIVAZ, M.; DECROLY, E.; SEIDAH, N. G.; JEANI, F.; THOMASI, G.; LEPPLA, S. H.; BUCKLEY, J. T.; VAN DER GOOT, F. G. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 32565-32661, 1998.
- ABREU, J. S.; ROVIERO, D. P.; URBINATI, E. C. Prevenção do estresse de captura em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com beta 1,3 glicano. In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA, 2006, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática (Aquabio), 2006.
- AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S. M.; NUNUS, E. S. S.; ITUASSU, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. A.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. Effect of high levels of vitamim C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 383-388, 2007.
- ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 128-136, 2008.
- ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1994. p.185-202.
- ANDRADE, V. X. L. **Desempenho reprodutivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz,1829), criado em sistema intensivo com dietas contendo diferentes níveis protéicos e suplementada com óleo de milho**. 2007. 98 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Fish pathogens diseases in farmed and wild**. Chichester: Ellis Horwood., 1987. p. 196-224.
- BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. Review: The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173–186, 2006.

BARBOSA, M. C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; ANDREATTA, E. R.; SEIFFERTI, W. Q.; CERQUEIRA, V. R. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 795-801, 2011.

BARKOH, A.; SMITH, D. G.; SOUTHARD, G. M. Pymnesium parvum control treatments for fish hatcheries. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 46, p. 108-120, 2010.

BELO, M. A. A. **Efeito do estresse por superpopulação e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 76 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2002.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Birmingham publishing Co, 1990. 482 p.

BOZZO, F. R. **Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitaminas C, E ou sua associação**. 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 302-308, 2007.

BRIDLE, A. R.; CARTER, C. G.; MORRISON, R. N.; NOWAK, B. F. The effect of β -glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 347-356, 2005.

BRUM, C. D. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2003.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1137-1144, 2006.

CAO, M. F.; GENG, W.; LIU, L.; SONG, C.; XIE, H.; GUO, W.; WANG, S. Glutamic acid independent production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. **Bioresource technology**, v. 102, p. 4251–4257, 2011.

CARNEVALI, O.; DE VIVO, L.; SULPIZIO, R.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-I, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, p. 430-438, 2006.

CASTRO, M. P. **Desempenho Produtivo e resposta inflamatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), alimentado com dieta suplementada com cromo trivalente**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

CHAKRABORTY, T.; MONTENEGRO, M. A.; SANYAL, S. C.; HELMUTH, R.; BULLING, E.; TIMMIS, K. N. Cloning of Enterotoxin Gene from *Aeromonas hydrophila* Provides Conclusive Evidence of Production of a Cytotoxic Enterotoxin. **Infection and immunity**, v. 46, p. 435-441, 1984.

CHEN, X.H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; EISENREICH, A.; SCHNEIDER, K.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; VOSS, B.; HESS, W. R.; REVA, O.; JUNGE, H.; VOIGT, B.; JUNGBLUT, P.R.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; LIESEGANG, H.; STRITTMATTER, A.; GOTTSCHALK, G.; BORRIS, R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1007–1014, 2007.

CIPRIANO, R. C.; BULLOCK, G. L.; PYLE, S. W. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonas and septicemias of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 315-343, 2001.

CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; MARCUSSO, P. F.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 1057-1062, 2013.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

COSTA, M. M.; DRESCHER, G.; MABONI, F.; MABONI, F.; WEBER, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, I.; VARGAS, A. C. Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental *Escheirichia coli* swine isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 30-36, 2010.

CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; RODRIGUEZ, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata L.*) induced by retinol acetate. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 13, p. 279-291, 2002.

DALMO, R. A.; BOGWALD, J. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 384-396, 2008.

DAS, A.; NAKHRO, K.; CHOWDHURY, S.; KAMILYA, D. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, p. 1547-1553, 2013.

DAVIS, D. W.; LOWESTEIN, T. K.; SPENCER, R. J. Melting behavior of fluid inclusions in laboratory-grown halite crystals in the systems NaCl-H₂O, NaCl-KCl-H₂O, NaCl-MgCl₂ -H₂O and NaCl-CaCl₂ -H₂O. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 54, p. 591-601, 1990.

DIAZ-ROSALES, P.; SALINAS, I.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, A.; CHABRILLON, M.; BALEBONA, M. C. Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 482-492, 2006.

DOOLEY, J. S. G.; TRUST, T. J. Surface Protein Composition of *Aeromonas hydrophila* Strains Virulent for Fish: Identification of a Surface Array Protein. **Journal of bacteriology**, v. 170, p. 499-506, 1988.

DUPONT, C. Probiotiques et prebiotique. **Journal de Pédiatrie et de Puériculture**, v. 14, p. 77-81, 2001.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Archives Immunologie Therapy Experimental**, v. 53, p. 199-206, 2005.

EL-RHMAN, A. Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. **Fish and Shellfish Immunology**, v.27, p.175-180, 2009.

ENDO, M.; ARUNLERTAE, C.; RUANGPAN, L. A new method for collection neutrophils using swim bladder. **Fisheries Science**, v. 63, p. 644-645, 1997.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; VIEIRA, F. C. F.; SHIMADA, M. T.; SILVA, T. F. A.; SOUZA, E. C.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E; MORAES, F. R. Humoral immune response in *Oreochromis niloticus*: modified direct agglutination test. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, p. 617-623, 2015.

FREUNDENBERG, M. A. The fate of lipopolysaccharides in rats: evidence of chemical alteration in the molecule. **Reviews of infectious diseases**, v.6, p. 483-487, 1984.

GATESOUBE, F. J. The use de probiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 180, p. 147-165, 1999.

GHADBAN, G. S. Probiotics in Broiler production – a review. **Archiv für Geflügelkund**, v.66, p. 49-58, 2002.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 1401-1412, 1995.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 287-292, 1999.

GONZALES, E. Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares. **Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2004. 48p.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, p. 665-671, 2005.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.46, p.47-55, 2010.

HASSAAN, M. S.; SOLTAN, M. A.; GHONEMY, M. M. R. Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, p. 199-208, 2014.

HOLLAND, M. C. H., LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399-420, 2002.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Disease**, v. 26, p. 59-62, 2003.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 633–642, 2002.

ISOLAURI, E. Quelles raisons pour un traitement probiotique chez les nourrissons allergiques? The rationale of probiotic therapy in allergic infants. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v. 41, p. 624-627, 2001.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 35-73, 2010.

JATOBA, A.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE NETO, C.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1201–1207, 2008.

JENKINS, J. A.; KLESIOUS, P. H. Glicitation of macrophage from the peritoneal cavity of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p. 69-74, 1998.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 491–511, 2006.

JORGENSEN, J. B.; SHARP, J. E.; SECOMBES, C. J.; ROBERSEN, B. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 267-277, 1993.

KLAENHAMMER, T. R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, 2001. p.797-811.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. 1990. p. 311-334.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 4ed. Jundiaí: Acqua Supre Com. Suprim. Aqüicultura Ltda. 2004. p.118.

KUMAR, R.; MUKHERJEE S. C.; RANJAN, R.; NAYAK, S. K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p.168-172, 2008.

KUMAR, R.; MUKHERJEE, S. C.; PRASAD, K. P.; PAL A. K. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). **Aquaculture Research**, v. 37, p.1215-1221, 2006.

KYAN, C.M. **Crescimento microbiano**, 2003. Disponível em <http://unb.br/ib//cel/microbiologia/crecimento/crescimento.html>. Acesso em: 10 de Julho de 2015.

LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; THAYUMANAVAN, T.; SUBASHKUMAR, R. *Aeromonas hydrophila*: A Re-Emerging Pathogen. In: RAMAIAH, N. (Ed.). **Marine Microbiology: Facets & Opportunities**. Goa: National Institute of Oceanography. 2005. p. 115-119.

LI, Q. Y.; YAN, Y. M.; WANG, A. L.; AN, X. L.; ZHANG, Y. Z.; HSAM, S. L. K.; ZELLER, F. J. Detection of HMW glutenin subunit variations among 205 cultivated emmer accessions (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*). **Plant Breedin**, v. 125, p. 120–124, 2006.

LIN, C. K.; SHRESTHA, M. K.; SHIVAPPA, R. B. Management to minimize the environmental impacts of pond draining: effects of harvest draining techniques on water quality and fish growth. In: McElwee, K., Burke, D., Niles, M., et al. (Eds.). **Sixteenth Annual Technical Report**. Corvallis, OR: Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, 1999. p. 131– 137.

LIU, Y.; CHEN, F.; ODLE, J.; LIN, X.; JACOBI, S. K.; ZHU, H.; WU, Z.; HOU, Y. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. **Journal of Nutrition**, v. 142, p. 2017-2024, 2012.

LUIS-VILLASEÑOR, I. E.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, M.; GÓMEZ-GIL, B.; ASCENCIO-VALLE, F.; CAMPA-CÓRDOVA, A.I. Beneficial effects of four *Bacillus strains* on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 321, p. 136-144, 2011.

MAGNADOTTIR, B. Immunological Control of Fish Diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 361- 379, 2010.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, p.137-151, 2006.

MANJU, R. A.; HANIFFA, M. A.; SINGH, S. V. A.; RAMAKRISHINAN, C. M.; DHARANAJ, M.; INNOCENT, B. X.; SEETHARAMAN, S.; AROCKIARAJ, A. J. Effect of dietary administration of efinol (R) FG on growth and enzymatic activities of *Channa striatus* (Bloch, 1793). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 796-801, 2011.

MARTINS, A.B. Melastomataceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; GIULIETTI, A.M.; MARTINS, S.E. (Eds.). **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. Vol. 6. São Paulo: Fapesp, 2009. 1-167 p.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. Carragenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 31-39, 2006.

MARTINS, M. L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados**. 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Aquicultura de Águas Continentais) - Centro de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2000.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M.; YAMAGUCHI, M. F. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v.38, p.213-218. 2008.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MEHRIM, A. I. Effect of dietary supplementation of Biogen® (Commercial Probiotic) on mono-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stock densities. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 4, p. 261- 273, 2009.

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

MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO, Santos, 2005. **Anais...** Santos: FACTA, p 53-68, 2005.

MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T. M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, p. 1-18, 2010.

METCHNIKOFF, E. **Lectures on the comparative pathology of inflammation**. Delivered at the Pasteur Institute in 1891. London: Kegan Paul, Trench, Trubner & Co, 1893.

MOHAPATRA, S.; KUKKAR, K. K.; ARJUN, A. S. Support surface related changes in feedforward and feedback control of standing posture. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 24, p. 144-52, 2014.

MORAES, A. C.; BELO, M. A. A.; PRADO, E. J. R.; MARINELLI, L.; GAGLIARD, P. C.; CARDOSO, F. Glucocorticoid activity of dexamethasone on cellular response in inflammatory exudate of tilapia, vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, n. 815, 2011. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/indiceautor.htm>>. Acesso em: 20 julho de 2015.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização em peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 625- 723.

MORAES, J. R. E.; FREITAS, J. B.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, p. 57-60, 2003.

MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; SILVA, B. C.; JESUS, G. F. A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 73–80, 2012.

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

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, v.45, p.297-304, 2007.

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

NAYAK, S. K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 892-896, 2007.

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; BYLUND, G.; SALMINEN, S.; LILIUS, E. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 443-52, 2003.

NOGA, E. J. **Fish Disease. Diagnosis and Treatment.** Mosby-Year Book: St Louis. 1995. 367p.

OLMOS, J.; OCHOA, L.; PANIAGUA, J. M. Functional Feed Assessment on *Litopenaeus vannamei* Using 100% Fish Meal Replacement by Soybean Meal, High Levels of Complex Carbohydrates and *Bacillus* Probiotic Strains. **Marine Drugs**, v.9, p.1119-1132, 2011.

OVERLAND, H. S.; PETTERSEN, E. F.; RONNESETH, A.; WERGELAND, H. I. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, p. 193–204. 2010.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 243, p. 241-254, 2005.

PARKER, R.B. Probiotics. The other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Ed. UEM, 1999, p. 264.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**., v.152, p.1-10, 1997.

PETRIC, M. C.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; MALHEIROS, E. B. Suplementação alimentar com vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 69-76, 2003.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P.H. Fish Vaccines In Aquaculture: Proactive Treatment Protects Salmon, Catfish, Other Fish. **Global Aquaculture Advocate**, v. 1, p. 44-45, 2010.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp-nov, nom rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 69-71, 1987.

REQUE, V. R.; MORAES, J. R. E.; BELO, M. A. A.; MORAES, F. R. Inflammation induced by *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, v. 300, p. 37-42, 2010.

RIDHA, M. T.; AZAD, I. S. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 843- 852, 2012.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R. Plasma cortisol and secondary stress response of cultures red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture**, v. 68, p. 115-130, 1988.

RODKHUM, C.; PIRARAT, N.; PINPIMAI, K. In Vitro Efficacy of HumanDerived Probiotic, Lactobacillus rhamnosus Against Pathogenic Bacteria in Fish and Frogs. **The Journal of Veterinary Medicine**, v.39, p.305-310, 2009.

SAFI, S.; ROODSARI, H. V.; AHMADI, M. R. The effect of levamisole hydrochloride on survival of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, p. 226-230, 2006.

SAHOO, P. K.; KUMARI, J.; MISHRA, B. K. Nonspecific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, n. 2, p. 151-5, 2005.

SAKABE, R. **Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SALINAS, I.; DIAZ-ROSALES, P.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; CHABRILLON, M.; MORINIGO, M.A. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 279-286, 2006.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 107-110, 1999.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C. S.; MORAES, J. R. E. de; MORAES, F. R. Inflammatory responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.98, p.235-241, 2012.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, p. 91-99, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SASAN, H.; ABD RAHIM, R.; LING, F. H.; RADU, S.; DAVOUD, H. M. Construction of vaccine from *Lactococcus lactis* bacteria using *Aeromonas hydrophila* virulent Aerolysin gene. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, p. 143-154, 2011.

SAULNIER, D. M.; SPINLER, J. K.; GIBSON, G. R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations of enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.135-141, 2009.

SCHRADER, K. K.; HARRIES, M. D.; DARWISH, A. M. In vitro comparisons of the inhibitory activity of florfenicol, copper sul phate and potassium permanganate towards *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 212-219, 2013.

SECOMBES, C.J. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. London: Academic Press, 1996. p. 63-105.

SEN, K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 957-966, 2005.

SHOEMAKER, C. A.; LAFRENTZ, B. R.; KLESIOUS, P. H.; EVANS, J. J. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Diseases**, v. 3, p. 537–544, 2010.

SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 908–916, 2012.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The genus *Bacillus* – non medical. In: DWORKIN, M; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKBRANDT, E. (Eds). **The Prokaryotes**, vol. 4, New York: Springer-Verlag, 2006. p. 1687-1688.

SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 273-313, 1994.

SOLTAN, M.A.; EL-Laithy, S. M. Effect of probiotics and some spices as feed additives on the performance and behaviour of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 12, p. 63–80, 2008.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425-433, 1990.

SUN, Y.; YANG, H.; LING, Z.; CHANG, J.; YE, J. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, 637-640, 2009.

SUN, Z.; DIAZ, Z.; FANG, X.; HART, M. P.; CHESI, A.; SHORTER, J.; GITLER, A. D. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. **PLoS Biology**, v. 9, p. e1000614, 2011.

SUTYAK, K. E.; WIRAWAN, R. E.; AROUTCHEVA, A. A.; CHIKINDAS, M. L. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal Applied Microbiology**, v.104, p. 1067-1074, 2008.

SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.149-160. 1992.

SWAIN, P.; SAHOO, P. K.; AYYAPPAN, S. **Fish & Shellfish Immunology: an introduction**. India: Narendra Publishing House, 2006. p. 296.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 107-114, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 383-388, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 423-431, 1999.

TOLEDO, N.; FERRER, J.; BORQUEZ, R. Drying and storage stability of a probiotic strain incorporated into a fish feed formulation. **Drying technology**, v.28, p.508-516, 2010.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, p. 486–503, 2011.

VIVEKANANDHAN, G.; HATHA, A. A .M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore. **Food Microbiology**, v. 22, p. 133-137, 2005.

VIZZOTTO, B.S. **Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009**. 2009, 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal Fisheries Research Board of Canada**, v.22, p. 909-914, 1970.

WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, p. 1124-1130, 1967.

WELKER, T. L.; LIM, C. Use of probiotics in diets of tilapia. **Journal of Aquaculture Research & Development (on-line)**, Suplem. 1, p. 1-8, 2011.

YANO, T. The nonspecific immune system: Humoral defense. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. London: Academic Press, 1996. p. 207–243.

YU, H. B.; SRINIVASA RAO, P. S.; LEE, H. C.; VILCHES, S.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; LEUNG, K. Y. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1248–1256, 2004.

ZMYSŁOWSKA, I., KORZEKWA, K., SZAREK, J. *Aeromonas hydrophila* in fish aquaculture. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, 313, 2009.