



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAUNESP



**Probiótico na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*):
avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e
desempenho produtivo**

Thaís Heloísa Vaz Farias

Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAUNESP



**Probiótico na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*):
avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e
desempenho produtivo**

Thaís Heloísa Vaz Farias

Orientadora: prof.^a Dr.^a Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Co-orientadora: prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Centro de Aquicultura da UNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2012

Jaboticabal – São Paulo

2012

“A adversidade desperta em nós
capacidades que, em circunstâncias
favoráveis, teriam ficado adormecidas”

Horácio

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe, que é a minha inspiração para vencer todos os obstáculos e maior incentivadora na minha formação pessoal e profissional.

À minha família, em especial, minha madrinha, padrinho e irmãos Natália e Pedro!!!

AGRADECIMENTOS:

À professora Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva pela orientação e oportunidade de crescimento na vida acadêmica, principalmente por me ajudar a administrar minha ansiedade e inexperiência durante esta etapa.

À minha co-orientadora professora Dra. Fabiana Pilarski que me deu a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, bem como as diversas oportunidades e aprendizado desde o estágio curricular.

Aos amigos do Lapoa: Róberson, Santiago, Nycolas, José, Fernanda, Lindomar, Robson, Siri, Roney e Gustavo Valladão pela contribuição nas coletas, assim como a amizade, convivência e alegria compartilhada. Adoro vocês!

Ao Róberson, Santiago, Nycolas e Lindomar pela amizade sincera, preocupação, ensinamentos e incentivo, demonstradas principalmente nos momentos mais difíceis. Sem vocês com certeza não teria concluído este trabalho. À vocês meu eterno carinho e gratidão.

À Dra. Danielle Dias e ao Dr. Leonardo Tachibana pela imensa ajuda e competência nas análises realizadas e principalmente pela infinita paciência

Aos amigos feitos durante a pós-graduação: Cynthia, Thálita, Pico, Mindú, Kotoko, Jeff, Sílvia Foca, Eduardo Urbinati, Patrick, Rafael Kuradomi, Fernanda Valentin, Regeane, Rosângela, Hirla, Donovan, Luíz, Jesaías...

Aos funcionários da CAUNESP: Veralice, David, sr. Mauro, Priscila, Valdecir Perereca e Silvinha pela força e grande ajuda durante todo o período da pós-graduação.

Ao profº. Dr José Carlos Barbosa, pelo auxílio na análise estatística.

Ao Luciano (Boga), Pedro Henrique e Jorge do Departamento de Medicina Preventiva da USP por me acolherem em seus laboratórios e pela disposição em me ajudarem todas às vezes que precisei, normalmente, em desespero.

Ao Francisco Neto (Chiquinho) pela enorme paciência e imensa ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores das disciplinas cursadas durante a pós-graduação e que muito contribuíram para o enriquecimento da minha formação acadêmica e profissional.

Ao Gustavo, meu namorado, pelo carinho, paciência e ajuda durante todo o período que estamos juntos

Aos amigos da antiga ksa de pau e às parceiras do saudoso Villela (Marina, Jaque, Marília...)

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2010/14330-4)

Muito obrigado à todos que fizeram parte dessa importante fase da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1. Pacu	9
2.2. Probióticos	10
2.3. <i>Bacillus</i>	14
2.4. Mecanismos de ação do probiótico	16
2.5. Probiótico e a estimulação da resposta imune em organismos aquáticos.....	18
2.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> e antimicrobianos na aquicultura.....	20
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Delineamento experimental.....	24
4.2. Balanceamento da ração e suplementação com probiótico.....	25
4.3. Manejo dos peixes	26
4.4. Monitoramento da qualidade da água.....	26
4.5. Desempenho zootécnico	27
4.6. Isolamento e quantificação dos probióticos <i>B. cereus</i> e <i>B. subtilis</i>	28
4.7. Análises hematológicas	29
4.8. Migração de fagócitos	30
4.9. Desafio por <i>Aeromonas hydrophila</i>	31
4.10. Análise estatística	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Desempenho produtivo	33
5.2. Isolamento e quantificação dos probióticos <i>B. cereus</i> e <i>B. subtilis</i>	37
5.3. Hematologia.....	41
5.4. Migração de fagócitos	48
5.5. Atividade respiratória dos leucócitos- <i>Burst</i> respiratório.....	52
5.5. Desafio por <i>Aeromonas hydrophila</i>	56
6. CONCLUSÕES	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Médias do peso inicial (PMI), do peso final (PMF), ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), consumo, conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e índice hepatossomático (IH) de juvenis de pacu alimentados com dietas suplementadas com níveis de probióticos <i>B. cereus</i> e <i>B. subtilis</i>	35
Tabela 2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC g ⁻¹) de <i>Bacillus cereus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> incorporadas na dieta de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) realizadas antes do início do experimento.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Unidades formadoras de colônias de *Bacillus subtilis* (UFC) isoladas do intestino de pacu após alimentação com diferentes níveis de inclusão do probiotico (A) durante 60 dias (B). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).38
- Figura 2. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bacillus cereus* isoladas do intestino de pacu alimentados com diferentes níveis de inclusão d probiótico (A) durante 60 dias (B). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).39
- Figura 3. Eritrograma e proteína total plasmática de juvenis de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).42
- Figura 4. Glicemia e cortisolemia de juvenis de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).45
- Figura 5. Trombograma (μL^{-1}) e leucograma (μL^{-1}) de juvenis de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).46

Figura 6. Capacidade fagocítica de fagócitos celomáticos de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).....	49
Figura 7. Índice fagocítico de fagócitos celomáticos de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à suplementação ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).	50
Figura 8. Atividade respiratória de leucócitos de sangue de pacus (médias \pm desvio padrão) alimentados com diferentes níveis de inclusão de probiótico durante 60 dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).	54
Figura 9. Mortalidade acumulada (%) de pacus submetidos à dieta suplementada com probiótico por 60 dias, após desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> . Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).	57

RESUMO

Dentre as espécies nativas criadas no Brasil, o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, tem apresentado aumento em produção, impulsionado pela sua rusticidade, rápido crescimento e carne de boa qualidade. Neste contexto, os estudos sobre a aplicação de probióticos na aquicultura intensificaram-se, visando à diminuição dos problemas sanitários encontrados nas pisciculturas e a substituição do uso de antibióticos, que têm se tornado uma barreira ao comércio internacional. A eficácia dos probióticos na aquicultura pode ser afetada por fatores como o tipo de probiótico e níveis de inclusão na dieta, espécie do hospedeiro e manejo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes níveis de inclusão do probiótico *B.subtilis* e *B.cereus* em dietas experimentais para pacu. Neste experimento foram utilizados 660 juvenis de pacus, com peso médio inicial de $67,0 \pm 7,0$ g, distribuídos em 20 tanques (500 L) e alimentados com probiótico durante 60 dias com quatro níveis de inclusão de *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 g) na ração experimental. Estes foram adicionados à ração experimental por meio de veículo oleoso. Foram avaliados: taxa de sobrevivência (TS), ganho em peso (GP), consumo alimentar diário (CAD), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), índices hepatossomático (IH), contagem e quantificação do número de probióticos na ração e no intestino dos peixes, número de eritrócitos, taxa de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de trombócitos, migração de fagócitos *in vivo*, atividade respiratória dos leucócitos, análises plasmáticas de cortisol, glicose e proteínas totais. Os animais não apresentaram melhora dos

parâmetros produtivos, assim como não houve diferença nos parâmetros hematológicos avaliados nos animais alimentados com probiótico. Na avaliação do *burst* respiratório não ocorreu diferença entre os tratamentos, porém foram observados maiores valores de capacidade e índice fagocítico nos grupos suplementados com as maiores doses de probiótico e conseqüentemente estes animais demonstraram maior proteção à infecção por *Aeromonas hydrophila*.

Palavras-chaves: *Piaractus mesopotamicus*, *Bacillus* sp, Hematologia, Imunologia, *Aeromonas hydrophila*.

Abstract

Among the native farming species in Brazil, pacu *Piaractus mesopotamicus*, has showed increase in the production, because your rusticity, growing fast and good quality meat. In this context, studies about the application of probiotics in the aquaculture have increase, with the aim of decrease of the sanitary problems found in the fish farms and the replacement of the antibiotics use that has become a barrier to international trade. The probiotics effectiveness in the aquaculture can be affected by factors how the kind of the probiotic and levels inclusion in the diet, host specie and management. At this, the aim of the research was to evaluate the influence of different levels of inclusion of the probiotic *B.subtillis* and *B.cereus* in assay diets for pacu. In this experiment was used 660 juvenile pacu, with average initial weight $67,0 \pm 7$ g, distributed in 20 tanks (500 L) and fed with probiotic during 60 days with four inclusion levels (2.0 g, 4.0 g, 8.0 g e 16.0 g) in the assay ration. The probiotic were added at ration por by oil vehicle. It were evaluated: survival rate (ST), weight gain (WG), daily food intake (DFI), feed conversion (FC), specific growing rate (SGR), hepatossomatic indices (HI), counting and quantification of the bacteria number in the ration and in gut the of the fish, erythrocytes number, hemoglobin rate, hematocrit, RBC indice, total count and differential of leucocytes, count of trombocytes, *in vivo* phagocytes migration, respiratory activity of the leucocytes (*burst*), plasmatic analyses of cortisol, glucose and total proteins. The animals didn't show improve in the production parameters and there wasn't difference in the hematological parameters evaluated in the animals fed with probiotic, too. In the evaluation of *burst* oxidative there wasn't difference between the treatments, but the activity phagocyte was better in the pacu fed with the higher doses and consequently these animals demonstrated greater protection of pacu infected by *A. hydrophila*.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*, *Bacillus* sp, Hematology, Immunology
Aeromonas hydrophila.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura, ou criação de organismos aquáticos, na qual está inserida a piscicultura, é o segmento da produção animal que mais cresce no cenário mundial atual, tendo superado as taxas de crescimento da bovinocultura, da avicultura e da suinocultura na última década (CREPALDI et al., 2007). De acordo com dados da FAO (2010), a aquicultura mundial apresentou crescimento médio de 6,5% ao ano no período entre 1998 e 2008, atingindo a produção de 68 milhões de toneladas de organismos aquáticos em 2008.

A produção mundial é liderada pelos países asiáticos, principalmente a China, que produz o equivalente a 62,4% da produção mundial, seguida de países da Europa (3,4%), América do Sul (2,15%), América do Norte e Central (1,41%) e África (1,40%). O Brasil apresentou crescente aumento na produção aquícola nos últimos anos, atingindo os melhores resultados em 2008 com produção de 365,4 toneladas destes produtos, acompanhando o crescimento da aquicultura mundial na última década e ocupando o 16º lugar na produção de organismos aquáticos (FAO, 2010)

Dentre as principais fontes protéicas produzidas no país entre 2007 e 2009, a produção de organismos aquáticos apresentou a maior taxa de crescimento (43,7%), seguido pelas aves (12,9%) e suínos (9,2%) (Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010).

O potencial do Brasil para a aquicultura se deve às condições climáticas favoráveis, à grande variedade de espécies com os mais variados hábitos alimentares e ambientes, grande extensão territorial, clima favorável e disponibilidade de recursos hídricos.

Dados do Ibama (2008) revelam que a aquicultura brasileira apresentou crescimento nas regiões Norte (12,1%), Nordeste (2,1%), Sudeste (13,2%), Sul (6,1%)

e Centro-Oeste (1,3%), em 2006. As principais espécies de peixes utilizadas na piscicultura dessas regiões são: a tilápia e carpa (exóticas), tambacu (híbrido), tambaqui, curimatá e pacu.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) HOLMBERG, 1887 (Characiformes; Characidae) é um peixe onívoro que apresenta fácil adaptação alimentar, rusticidade sob condições de criação, adaptabilidade aos diversos ecossistemas aquícolas, facilidade de captura, esportividade e carne de boa qualidade, contribuindo para a rápida popularização da criação dessa espécie. Além disso, países da América Latina têm grande interesse na criação desta espécie devido a sua distribuição geográfica ao longo do rio Paraná (OLIVEIRA, 2004; ASSIS et al., 2004).

O desenvolvimento da aquicultura brasileira apresenta limitações relacionadas aos aspectos sanitários na criação de peixes, pois altas densidades e manejo intensivo predis põem ao aparecimento de doenças nos peixes (SAKAI, 1999). Os principais fatores responsáveis pelo surgimento dessas doenças são a deterioração da qualidade da água, estresse e manejo inadequado, tornando-os mais susceptíveis aos agentes oportunistas e patogênicos (WEDEMEYER, 1969; ALKAHEM, 1994).

Devido a esse quadro, os antibióticos têm sido usados de forma indiscriminada e sem critérios na criação de peixes tanto para o tratamento de doenças bacterianas, como profilaticamente e, como promotor de crescimento. Com isso, pode levar 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 (CABELLO, 2006). Portanto, colocando em risco a saúde do consumidor com a presença dos resíduos dessas drogas, além de atuar como uma barreira ao comércio internacional Além disso, alguns autores relatam que os genes de resistência aos antibióticos podem ser transferidos para o ambiente e também para as bactérias

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

A utilização de alimentos funcionais vem se intensificando nos últimos anos, pelo fato de favorecerem não só a nutrição básica, mas também pode promover o aumento da eficiência alimentar e taxa de crescimento, associado muitas vezes à melhoria na saúde destes animais. Dentre estes alimentos utilizados na aqüicultura, os imunonutrientes (vitaminas e minerais), imunostimulantes, prebióticos e probióticos são os mais utilizados (OLIVEIRA et al., 2002).

As bactérias probióticas atuam no hospedeiro melhorando a utilização dos alimentos, modulando a microbiota intestinal, estimulando a resposta imune e inibindo a colonização de patógenos no trato gastrointestinal (QINGHUI AI et al., 2011). Os probióticos são de uso rotineiro para humanos, e na produção animal desempenham funções terapêutica, profilática e promotora de crescimento (OUWEHAND et al., 2002; SENOK et al., 2005).

A utilização de probióticos em organismos aquáticos pode ser feita por adição na ração e/ou inclusão na água dos tanques de criação. A adição deste produto na água dos tanques de larvicultura e alevinagem promove mudanças na composição microbiológica ambiental, reduzindo a carga de patógenos. Por outro lado, a inclusão na dieta modifica a microbiota intestinal, por meio da competição com os microrganismos patogênicos por sítios de adesão e nutrientes, produção de substâncias antibacterianas e enzimas (CYRINO et al., 2010).

Apesar do potencial dos probióticos na aqüicultura no que diz respeito à melhoria dos parâmetros zootécnicos e das condições sanitárias da produção, diversos fatores influenciam na sua eficácia, tais como seleção da cepa bacteriana utilizada como probiótico, espécie e idade do hospedeiro, sistema de criação, via de administração,

dose e duração da suplementação, a qual os peixes foram submetidos. Portanto, tornam-se necessários novos estudos na área de nutrição e saúde para a instituição de protocolos de utilização dos aditivos alimentares e melhor elucidação dos mecanismos de ação das bactérias probióticas na fisiologia e imunologia dos peixes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pacu

O pacu, pertence à ordem dos Characiformes, família Characidae e subfamília Myleinai. A espécie é originária dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (GODOY, 1975) e está distribuída da região nordeste da Argentina até a região centro-oeste do Brasil. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (2010), esta é a quarta espécie de peixe mais produzida no Brasil atingindo em 2009 a produção anual de 18,171 toneladas, ficando atrás somente da tilápia da carpa e do tambaqui. A importância da produção de pacu no país deve-se as suas características zootécnicas, tais como rusticidade sob condição de criação, aceite de ração tanto extrusada quanto peletizada, altas taxas de crescimento, desova anual, carne de boa qualidade e grande aceitação no mercado nacional (JOMORI et al., 2005).

A espécie apresenta hábito alimentar onívoro, ocorrendo alterações alimentares de acordo com as variações do ambiente e períodos de migrações reprodutivas (GONÇALVES e URBINATI, 2005). Devido ao crescente interesse na produção intensiva desta espécie, as condições estressantes de criação tornam-se frequentes, o que geralmente acarretam distúrbios do seu estado fisiológico e predisõem ao aparecimento de doenças. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas e métodos (aditivos alimentares) que promovam maior resistência dos peixes às infecções, por meio da regulação do sistema imune, assume grande importância. Na aquicultura, os aditivos alimentares mais estudados são as vitaminas, os minerais, os imunostimulantes, os prebióticos e probióticos (OLIVEIRA et al., 2002).

2.2. Probióticos

Muitas definições têm sido propostas para o termo probiótico, sendo a primeira proposta por LILY e STILLWELL (1965) caracterizando-os como “substâncias secretadas por um microorganismo, a qual estimula o crescimento de outro”. PARKER (1974) conceituou o termo probiótico como “organismos ou substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal”. A abordagem mais amplamente citada foi proposta por FULLER (1989) definindo-os como “produtos constituídos por microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal.” A definição dos probióticos foi complementada pela FAO/OMS (2001) como “microorganismos vivos que quando administrados em doses adequadas conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro”.

A definição mais específica do uso de probióticos em peixes foi proposta por KESARCODI-WATSON et al. (2008) que as definiram como microrganismos vivos que quando adicionados à dieta podem contribuir para o crescimento e a resposta imune dos organismos aquáticos.

VERSCHUERE et al. (2000) relacionando a íntima relação entre os organismos aquáticos e o ambiente, definiram os probióticos de maneira mais abrangente: "vida microbiana adjunta que tem efeito benéfico na associação, modificando a comunidade microbiana associada ou ambiente, garantindo uma melhor utilização do alimento para os animais ou a reforçar o seu valor nutritivo, através do reforço da resposta a doença, ou através da melhoria da qualidade do seu meio ambiente”.

As características desejadas para que os probióticos sejam considerados eficazes e seguros como aditivos na saúde animal e humana são: (1) não tóxico e não patogênico (2) habitante natural da microbiota intestinal da espécie alvo (3) sobrevivência e

colonização no trato gastrointestinal, ou seja, resistência ao ácido gástrico e bile (4) produção de substâncias antimicrobianas (5) antagonista às bactérias patogênicas (6) modulação de resposta imunológica (7) adequadas características organolépticas (8) manutenção da viabilidade do aditivo sob condições normais de armazenamento e (9) adequado tecnologicamente para o processamento industrial, como no processo de liofilização (BALCÁZAR, 2006).

Há vários relatos sobre a aplicação de probióticos na produção animal que demonstraram diversos efeitos benéficos não só sobre os índices zootécnicos em ruminantes, suínos, aves e peixes, mas também favoreceram o bem-estar, sobretudo por meio da modulação da microbiota intestinal promovendo a manutenção da saúde do hospedeiro (TUOHY et al., 2005).

Em ruminantes, os estudos demonstraram a redução da gastroenterite e melhora de diversos índices de desempenho zootécnico (AGARWAL et al., 2002; ADAMS et al., 2008). Em suínos foi demonstrada a redução da morbidade e mortalidade de leitões desmamados e melhora dos parâmetros zootécnicos e na qualidade da carcaça na fase de engorda (ALEXOPOULOS, 2004). Em aves, a suplementação com probiótico demonstrou efeitos positivos, melhorando o ganho de peso e aumentando a conversão alimentar (KALAVATHY et al., 2003; MOUNTZOURI et al., 2007) . A suplementação em pintinhos suprimiu a colonização e persistência de bactérias patogênicas no intestino (LA RAGIONE e WOODWARD, 2003).

A aplicação de probiótico na aquicultura deve ser avaliada de forma diferente da sua aplicação em organismos terrestres, devido à íntima relação entre os organismos aquáticos e o meio externo, sendo assim, os agentes patogênicos são capazes de manterem-se no ambiente do animal (água) e multiplicarem-se isoladamente no animal hospedeiro (HANSEN e OLAFSEN, 1999; VERSCHUERE et al., 2000).

Dentre os probióticos utilizados na aquicultura destacam-se os 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*), a levedura *Saccharomyces*. e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus*, (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

Diversos autores relataram os efeitos positivos da aplicação de probióticos na aquicultura. Segundo MORIARTY (1998), a adição de probióticos na dieta melhorou a qualidade da água e a saúde dos organismos aquáticos. BOYD (1999) relatou o efeito benéfico dos probióticos na decomposição da matéria orgânica e nos parâmetros de qualidade de água como a redução dos níveis de fósforo e nitrogênio, assim como o controle de outros compostos nitrogenados, tais como amônia, nitrato e nitrito. DIAS et al (2010) demonstrou que o uso de probióticos em rãs produziu efeitos benéficos no ganho de peso e na conversão alimentar desses animais. Além disso, os animais apresentaram aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, portanto demonstrando efeito imunoestimulante sobre as rãs. Segundo DECAMP e MORIARTY (2006), o fornecimento de dietas com inclusão de *Bacillus* sp. como probiótico aumentaram a sobrevivência de camarões cultivados e promoveu a diminuição de *Vibrio* sp. na água dos tanques e no sedimento, obtendo resultados semelhantes aos obtidos com o uso de outras substâncias antimicrobianas.

SAENZ DE RODRIGUEZ et al. (2009) observaram melhora na taxa de crescimento e no aproveitamento de nutrientes em juvenis de linguado (*Solea senegalensis*). Estes autores mostraram as mudanças estruturais na mucosa e do perfil microbiológico do intestino dos peixes suplementados com probióticos quando

comparados ao grupo controle e assim relataram a interação entre essas mudanças e a performance de crescimento desses animais.

Juvenis de bagre africano (*Clarias gariepinus*) alimentados com *Lactobacillus acidophilus* também apresentaram maior taxa de crescimento e de sobrevivência associado com melhoria dos parâmetros hematológicos (aumento volume corpuscular médio e do nível de hemoglobina, aumento das proteínas totais, maior número de células vermelhas e de leucócitos) quando comparados ao grupo controle (ALDOHAIL, 2009).

A influência positiva no crescimento e na atividade de enzimas digestivas por meio da adição de *Lactobacillus* na dieta de dourada (*Sparus aurata*) na fase larval foi observada por SUZER et al. (2008). Resultados semelhantes foram observados em juvenis de carpa comum (*Cyprinus carpio*) suplementadas com *Bacillus* sp. dieta (WANG e XU, 2006).

A utilização de bactérias ácido lácticas promoveu o controle da microbiota patogênica em linguado (*Solea solea*) (VÁSQUEZ et al., 2005) e maior taxa de crescimento em juvenis de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (CARNEVALLI et al., 2006).

O uso de probióticos no controle de doenças é relatado para diversas espécies de peixes e patógenos. GATESOUBE (1999) descreveu o efeito antagonista de probióticos sobre os patógenos, o estímulo do sistema imune e o aumento da resistência de várias espécies de peixes contra as doenças. RAIDA et al. (2003), relataram maior taxa de sobrevivência de peixes expostos a diversos patógenos quando alimentados com dietas suplementadas com *Bacillus subtilis* e *B.licheniformis*.

SON et al. (2009) observaram maior ganho de peso e resistência à *Streptococcus* e iridovírus em peixes alimentados com *Lactobacillus plantarum*. A suplementação

alimentar de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com *Lactobacillus rhamnosus* mostrou-se efetiva no controle da mortalidade frente ao desafio com *Aeromonas salmonicida*, agente infeccioso da furunculose (NIKOSKELAINEN, 2001).

A avaliação da suplementação alimentar com *Enterobacter cloacae* associado com *Bacillus mojanensis* como potencial probiótico para truta arco-íris mostraram resultados positivos em relação à taxa de sobrevivência de peixes infectados com *Yersinia ruckeri* (CAPKIN, 2008). Houve também efeitos significantes sobre os parâmetros hematológicos e de ganho de peso (CAPKIN, 2008). O fornecimento de *Carnobacterium* sp. para larvas e juvenis de truta arco íris e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) demonstrou maior sobrevivência dos peixes quando desafiados por meio de co-habitação com diferentes patógenos. PIETERS et al. (2008) obtiveram resultados positivos com a utilização de *Aeromonas sobrea* como probiótico no controle de *Ichthyophthirius multifiliis* em truta arco-íris.

2.3. Bacillus

O gênero *Bacillus* engloba bactérias gram-positivas, que apresentam capacidade de esporular, permitindo que o microorganismo se mantenha viável durante um período maior no trato gastrointestinal dos animais (HUANG et al., 2008), além da sua maior viabilidade após o processo de peletização da ração, portanto apresentando maior vantagem na sua utilização como probiótico em relação a outras bactérias que são fornecidas na forma vegetativa (HONG et al., 2005).

Na aquicultura, o *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são os mais comumente utilizados como probióticos (TIMMERMAN, 2004). Os estudos sobre a

utilização de *Bacillus* sp. como probiótico mostraram que estes possuem habilidades de adesão na parede intestinal, produção de bacteriocina (peptídeos antimicrobianos) e aumento das respostas imunológicas (CHERIF et al., 2001; CLADERA-OLIVERA et al., 2004; DUC et al., 2004; BARBOSA et al., 2005).

RAIDA et al. (2003) relataram o aumento da resposta imunológica de truta arco-íris frente ao desafio com *Yersinia* sp., após o fornecimento do probiótico comercial contendo espécies de *Bacillus*. Adicionalmente, *B. subtilis* adicionado à água de criação de larvas de robalo (*Centropomus undecimalis*) apresentaram atividade antibiótica contra *Vibrio* sp. (KENNEDY et al., 1998).

Bacillus subtilis pode aumentar o crescimento e a taxa de sobrevivência de camarões (RENGPIPAT, 2000) e ser efetivo no controle de *Vibrio* sp. quando adicionados a água dos tanques de criação (VASEEHARAN et al., 2003).

Os efeitos da administração de *B. subtilis* na água de criação da tilápia do Nilo foram positivos para obtenção de um maior crescimento e para os parâmetros imunológicos avaliados, como a atividade de burst respiratório (ZHOU et al., 2009).

ALY et al. (2008) demonstraram aumento da taxa de sobrevivência e do ganho de peso em tilápia alimentada com *B. subtilis* e *L. acidophilus*, além da inibição do crescimento *in vitro* de bactérias patogênicas. O uso de *B. subtilis* associado com vitamina C em carpas não apresentou aumento significativo nos diversos parâmetros imunológicos avaliados quando comparado aos grupos de peixes tratados individualmente com *B. subtilis* e vitamina C, todavia, o grupo tratado apenas com *B. subtilis* apresentou maior resposta imunológica que os demais grupos (NAYAK, 2007).

A associação de *B. subtilis* com *B. licheniformes* apresentou resultados positivos na taxa de crescimento e na utilização do alimento pela truta arco-íris (BAGUERI et al., 2008; MERRIFELD et al., 2009; 2010). Estes autores obtiveram os melhores resultados

quando as bactérias probióticas tiveram a capacidade de colonização superior a 80% do trato gastrointestinal da espécie.

Melhora do crescimento em tilápia do Nilo (EL- HAROUN et al., 2006), carpa (KUMAR et al., 2006) e no peixe coelho (*Siganus puellus*) (EL- DAKAR et al., 2007) alimentadas com dieta suplementada com *Bacillus subtilis* também foram demonstradas.

2.4. Mecanismos de ação do probiótico

Os mecanismos de ação dos probióticos, descritos por FULLER (1989) são: (1) produção de compostos com atividades antimicrobianas, competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão eliminando assim, o número de células bacterianas viáveis, levando à supressão; (2) alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática e (3) estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos.

2.4.1. Competição por sítios de adesão e nutrientes: Os probióticos competem com outros microorganismos por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal e por nutrientes, deste modo, inibindo a fixação e sobrevivência dos patógenos. A aderência dos probióticos às células epiteliais do intestino estimula a produção de defensinas e muco, que são substâncias que exercem função protetora contra patógenos na superfície da mucosa intestinal. (LEBEER et al., 2010) Os microorganismos probióticos quando adaptados à microbiota do hospedeiro são capazes de metabolizar os nutrientes de forma mais rápida, assim tornando- os indisponíveis para as bactérias patogênicas e controlando a proliferação destas (PANCHENIAK, 2005)

2.4.2. Produção de substâncias bacterianas e enzimas: As bactérias probióticas podem produzir e liberar compostos de ação bacteriana como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio que tem ação bacteriana sob os microorganismos patogênicos. As bacteriocinas são proteínas antimicrobianas que exercem ação antagonista sobre diversos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*. O peróxido de hidrogênio também está associado à inibição dos patógenos, principalmente das bactérias gram negativas, como demonstrado por PRIDMORE et al. (2008) que observaram que o peróxido de hidrogênio produzido pela bactéria *Lactobacillus johnsonii*, apresentou efeito inibitório de *Salmonella*. O efeito químico exercido pelos probióticos através da produção de ácidos orgânicos (lático e propiônico) reduz o pH intestinal, inibindo o crescimento das bactérias patogênicas (GHABDAN, 2002). BAIRAGI et al. (2004) atribuíram às enzimas amilolíticas produzidas por *B. subtilis* e *B. circulans* a melhor digestão e aproveitamentos dos nutrientes, refletindo em maior crescimento e melhor taxa de conversão alimentar em carpas.

2.4.3. Estímulo da imunidade do hospedeiro: Diversos estudos sugerem o efeito imunomodulatório dos probióticos por meio da interação com células dendríticas, ativação de macrófagos, estimulação de células T, aumento da produção de imunoglobulinas, anticorpos e citocinas (OLIVEIRA et al., 2002; PANCHENIAK, 2005).

2.5. Probiótico e a estimulação da resposta imune em organismos aquáticos

O sistema imunológico dos peixes difere de outros vertebrados pelo fato da resposta inata ser mais importante do que a resposta adquirida. (SAURABY e SAHOO, 2008). Os tecidos linfóides dos peixes estão distribuídos no rim cefálico, baço e tecidos associados com o intestino (PARTORET et al., 1998). A resposta inata ou não específica é definida como um conjunto de mecanismos que protege o organismo contra infecções, sem uma prévia exposição ao agente causador (BOLS et al., 2001).

A regulação da resposta imunológica é o efeito benéfico mais comumente relatado em peixes quando suplementados com probióticos. Em teleósteos, as bactérias probióticas interagem com as células mononucleares fagocíticas (monócitos e macrófagos), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células natural killer para melhorar a resposta inata, por meio do incremento da atividade fagocítica (NAYAK, 2010). Esse aumento da atividade fagocítica ocorre por meio da maior mobilização de neutrófilos (SIWICKI et al., 1998) que liberam grandes quantidades de peroxidase, enzima lisossômica presentes nas células fagocíticas, promovendo a oxidação de certos compostos pelas espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ânions oxigênio) no processo de fagocitose.

Diversas espécies de peixes suplementadas com probióticos demonstraram melhora da atividade fagocítica e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos (IRIANTO e AUSTIN, 2003; DÍAZ-ROSALES et al., 2006; SALINAS et al., 2006). ALY et al. (2008) demonstrou aumento da lisozima e da atividade respiratória dos leucócitos em tilápia do Nilo suplementada com *B. subtilis* e *Lactobacillus acidophilus*. SON et al. (2009) descreveram a melhora dos parâmetros imunológicos não específicos, como a atividade respiratória dos leucócitos, atividade

fagocítica e mediadores químicos solúveis em *Epinephelus coiodes* submetidos à suplementação com *Lactobacillus plantarum* durante quatro semanas.

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

Em diferentes espécies de peixes, a suplementação dietética com certos probióticos aumentou o número de células relacionadas à resposta imune. KUMAR et al. (2008) demonstraram o aumento de monócitos e granulócitos em carpas suplementadas com *B. subtilis* após o desafio experimental com *Aeromonas hydrophila*, assim como ALY et al. (2008) relataram os efeitos benéficos da suplementação com probióticos para tilápia.

IRIANTO e AUSTIN (2002) utilizaram diversas bactérias probióticas inativadas para o controle da furunculose em truta arco-íris e relataram o aumento de eritrócitos, linfócitos e macrófagos após 14 dias de alimentação.

A ação dos probióticos na indução da resposta imunológica no intestino ocorre a partir do estabelecimento e interação com as células linfóides, macrófagos, granulócitos e IgM presentes neste órgão (NAYAK, 2010). As partículas antigênicas ou produtos degradados pela bactéria probiótica possibilitam o contato com as células do tecido linfóide (GALDEANO e PERDIGÓN, 2004).

Os peixes possuem capacidade de capturar antígenos na porção média do intestino seguido pelo transporte e processamento pelos macrófagos intra-epiteliais, como relatado em carpas por ROMBOULT et al. (1985) e ROMBOULT (1989). A ação imunológica no intestino por meio da suplementação com probióticos foi demonstrada

em estágios larvais de dourada resultando no aumento de células granulocíticas (PICCHIETTI, 2007). PICCHIETTI et al. (2009) relataram aumento significativo na presença de células T e granulócitos no tecido linfóide presente no intestino de robalo através da suplementação com *Lactobacillus delbrueckii*.

Em truta arco-íris alimentadas com dieta contendo *Carnobacterium divergens* e *C. maltaromaticum* houve aumento da atividade da lisozima presente na mucosa intestinal (KIM e AUSTIN, 2006) e maior atividade fagocítica de leucócitos da mucosa quando alimentados com probióticos pertencentes ao grupo das bactérias ácidos lácticas (BALCAZAR et al., 2006).

2.6. *Aeromonas hydrophila* e antimicrobianos na aquicultura

Os surtos causados pela infecção por *Aeromonas* são considerados um dos principais problemas na aquicultura mundial nos últimos anos (ZMYSLOWSKA et al., 2009). Em particular, a espécie *Aeromonas hydrophila*, um dos principais agentes patogênicos oportunistas de peixes de água doce, sendo responsável por grandes perdas na produção e comercialização de peixes (VIVEKANANDHAN et al., 2005; CAO et al., 2010).

A bactéria *A. hydrophila* é gram-negativa e está presente na microbiota aquática e na microbiota intestinal de peixes saudáveis. Estas bactérias são tipicamente oportunistas, organismos patogênicos facultativos, apesar de muitas vezes aparecerem como agentes primários causadores de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce. A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água, acometendo peixes em condições de estresse (JENEY & JENEY, 1995) e/ou à presença de parasitos (MARTINS, 2000), podendo prejudicar as funções das brânquias, tegumento e intestino.

Algumas espécies de *Aeromonas* têm sido reconhecidas como patógenos causadores de infecções intestinais ou extra-intestinais no homem, assumindo relevância epidemiológica em casos de infecções oportunistas em pacientes imunossuprimidos (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003; PEREIRA et al., 2008), o que levou a OMS (2003) a classificá-la problema de saúde pública.

A aeromoniose (septicemia hemorrágica) é caracterizada pela presença de petéquias, equimoses, grandes lesões ulcerativas na superfície da pele, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, exoftalmia e acúmulo de líquido na cavidade celomática, além de anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN E AUSTIN, 1987; KIROV et al., 2002).

A utilização de antimicrobianos para o controle de enfermidades na aquicultura é realizada de maneira indiscriminada, sendo utilizado, além da função terapêutica também como medida profilática, levando à imunossupressão dos animais, seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático, alteração da microbiota dos ambientes de cultivo e a transferência de resistência para bactérias potencialmente patogênicas aos seres humanos (HÖLMSTROM et al., 2003). Portanto, há uma tendência mundial em restringir a utilização destes produtos na aquicultura, a fim de reduzir a resistência aos antimicrobianos entre as bactérias patogênicas ou da flora comensal dos organismos aquáticos, além de evitar o risco da presença de resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano (BRUUN et al., 2003). Diante disso, buscam-se alternativas ao uso de antimicrobianos para o controle de enfermidades na piscicultura. Dentre as alternativas, a incorporação de probiótico na dieta de peixes pode ser efetiva no controle de enfermidades na piscicultura, pois além de atuarem no incremento da imunidade não específica destes animais, também contribuem para o desenvolvimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal, assim reduzindo o crescimento de bactérias

patogênicas, resultando entre outras coisas, na melhoria do aproveitamento dos nutrientes.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de quatro níveis de inclusão de *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* sobre as respostas hematológicas, bioquímicas, imunológicas, desempenho produtivo de pacu e resistência à infecção por *Aeromonas hydrophila*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP.

Os juvenis de pacus provenientes de uma piscicultura comercial foram aclimatados durante 15 dias em tanques de 500 litros com aeração contínua e controle de temperatura ($26,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$) e alimentados com ração comercial (32% PB) duas vezes ao dia *ad libitum* antes do início do período experimental.

As análises bromatológicas das rações experimentais fornecidas no experimento foram processadas no Laboratório de Nutrição Animal/LANA da UNESP - Jaboticabal, SP. As análises microbiológicas das mesmas foram realizadas antes do início do experimento no Departamento de Patologia Veterinária da UNESP – Jaboticabal, SP.

Durante 60 dias, 660 juvenis de pacus, com peso médio inicial de $67 \pm 7\text{g}$ foram distribuídos em 20 caixas experimentais (33 peixes em cada) de 500 L, com aeração contínua e fluxo de água contínuo.

4.1. Delineamento experimental

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Foram avaliados quatro níveis do probiótico comercial PAS-TR®, formulado com *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (1:1) na ração experimental. Cada unidade experimental foi composta por 33 juvenis, com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando 20 unidades experimentais.

Os cinco tratamentos foram constituídos por ração controle isenta de probiótico e por quatro dosagens do probiótico PAS- TR[®] adicionadas à ração experimental :

- 1) Ração controle (sem adição de probiótico);
- 2) *Bacillus cereus* 2,0 x 10⁸ UFC/g e *Bacillus subtilis* 2,0 x 10⁸ UFC/g;
- 3) *Bacillus cereus* 4,0 x 10⁸ UFC/g e *Bacillus subtilis* 4,0 x 10⁸ UFC/g;
- 4) *Bacillus cereus* 8,0 x 10⁸ UFC/g e *Bacillus subtilis* 8,0 x 10⁸ UFC/g;
- 5) *Bacillus cereus* 16,0 x 10⁸ UFC/g e *Bacillus subtilis* 16,0 x 10⁸ UFC/g

4.2. Balanceamento da ração e suplementação com probiótico

As rações utilizadas durante o período experimental foram adquiridas na fábrica de ração Âmbor Amaral, apresentando 32% de proteína total, 6% de fibra bruta e 6% de extrato etéreo e sem a presença de óleo para possibilitar a posterior inclusão do probiótico.

O probiótico comercial PAS-TR[®] liofilizado contendo *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na concentração de 10⁸ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias) foi adicionado nas rações por meio de veículo oleoso (2% de óleo de soja) para a incorporação do probiótico ao pelete.

Análises microbiológicas das rações experimentais foram realizadas antes do início da alimentação dos peixes a fim de quantificar os *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* na ração.

4.3. Manejo dos peixes

Os peixes foram submetidos à anestesia com benzocaína ($1\text{g } 10\text{L}^{-1}$) até a perda do equilíbrio para facilitar o manejo e evitar possíveis danos físicos. Em seguida foram pesados e medidos no início do experimento, com o auxílio de balança eletrônica e ictiômetro, respectivamente. Após a biometria inicial os peixes passaram por um período de aclimação de 15 dias antes do início da alimentação com as dietas experimentais. Durante o período de avaliação, a alimentação foi fornecida diariamente, duas vezes ao dia às 9:00 e 17:00 h e iniciou-se o experimento quando os peixes atingiram o peso médio e comprimento médio inicial de $67,6 \pm 4,17\text{ g}$ e $14,5 \pm 0,20\text{ cm}$, respectivamente.

4.4. Monitoramento da qualidade da água

O monitoramento da qualidade da água foi realizado duas vezes na semana avaliando-se a temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido (com oxímetro YSI mod. 55), o potencial hidrogeniônico com pHmetro digital, e a condutividade elétrica com condutivímetro. Os parâmetros de água avaliados permaneceram dentro da faixa de conforto para a espécie, segundo Proença e Bittencourt (1994) com temperaturas médias de $26,6^\circ\text{C}$, pH $7,89 \pm 0,09$, oxigênio dissolvido $6,7 \pm 0,59\text{ mgL}^{-1}$ e amônia $0,12 \pm 0,11\text{ mgL}^{-1}$.

4.5. Desempenho zootécnico

Para a análise do desempenho produtivo foram realizadas biometrias no início e no final do período experimental. Antes de cada biometria, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (100mg L⁻¹) até a perda do equilíbrio. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

a) **Taxa de sobrevivência (TS)** = $\frac{\text{Número de peixes sobreviventes}}{\text{Número de peixes iniciais}}$;

b) **Ganho de peso (GP)** = Peso final (g) - Peso inicial (g);

c) **Taxa de conversão alimentar (TCA)** = $\frac{\text{Consumo alimentar}}{\text{Ganho de peso}}$;

d) **Consumo alimentar diário (CAD)** = $\frac{\text{Consumo alimentar}}{\text{nº dias}}$ * 100;

e) **Taxa de crescimento específico (TCE)** = $\frac{\text{Ganho de peso}}{\text{Peso inicial} \times \text{tempo}}$ * 100

Em cada coleta (0,7, 15, 30 e 60 dias) foram capturados 12 exemplares de cada tratamento (3 peixes de cada repetição), que foram anestesiados (benzocaína 1g 10L⁻¹) e submetidos à coleta sanguínea por meio de punção do vaso caudal. Em seguida, os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico para coleta e pesagem do fígado para cálculo do índice hepatossomático (IHS = peso fígado/peso peixe).

4.6. Isolamento e quantificação dos probióticos *B. cereus* e *B. subtilis*

A avaliação da colonização do intestino pelas bactérias probióticas foi realizada por meio da contagem e quantificação de colônias bacterianas características dos *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* encontrados no intestino.

Foram realizadas coletas nos dias 7, 15, 30 e 60 de alimentação para a avaliação da colonização pelas bactérias probióticas *B. cereus* e *B. subtilis* do intestino dos peixes.

Quatro exemplares de peixes de cada tratamento (1 peixe de cada repetição) foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico (benzocaína 1g 10L⁻¹). Foram coletadas, para análise microbiológica, as porções anterior, média e posterior dos intestinos.

Após a abertura do intestino dos peixes, para retirada de fezes, os mesmos foram lavados com água destilada. Em seguida, os fragmentos de intestino foram pesados e diluídos em 10 ml de solução salina estéril a 0,85%, para posteriores diluições seriadas até 10⁻⁶. Foram semeadas 0,1ml da solução em superfície de meio seletivo para *B. cereus* (*Bacillus cereus* Agar Base - Acumedia®) e *B. subtilis* (Nutrient Agar - Acumedia®). Além disso, foram semeadas 0,1 ml da solução em Agar PCA (Plate Count Agar - Himedia®) para contagem de bactérias totais presentes no intestino. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas, para posterior contagem das colônias (TACHIBANA et al, 2010).

As colônias foram contadas em contador de colônias e identificadas (identificação presuntiva), de acordo com suas características morfológicas, de crescimento e gram.

4.7. Análises hematológicas

Para as análises hematológicas, nos dias 0, 7, 15, 30 e 60 após a suplementação alimentar com o probiótico, foram colhidas amostras de sangue de 12 peixes por tratamento (3 peixes de cada repetição). Os peixes foram anestesiados com solução aquosa de benzocaína, sendo coletados cerca de 2,0 mL de sangue, por meio de punção do vaso caudal, utilizando-se agulhas e seringas heparinizadas 100 UI.

A partir das amostras sanguíneas, procedeu-se a determinação do hematócrito pela técnica do microhematócrito (GOLDENFARB et al. 1971), dosagem da taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944) e contagem de eritrócitos utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato, realizando a contagem em hemocítômetro. A partir dos dados obtidos, foram calculados os índices hematimétricos, compreendidos pelo Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright, e utilizadas na leucometria diferencial e total, bem como para trombometria total (HRUBE & SMITH, 1998).

Após as análises hematológicas, o sangue remanescente foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos e utilizado para determinação das proteínas totais, por refratômetro, cortisol pelo método de ELISA utilizando o kit DBC (Diagnostics Biochem Canadá Inc.) e glicose por kit da LABTEST®.

O sangue coletado para as análises hematológicas e bioquímicas também foi utilizado para a análise da atividade respiratória dos leucócitos (*burst* respiratório), segundo protocolo de ANDERSON & SIWICHI (1995) modificado por BILLER (2008). O método consistiu em determinar as espécies reativas de oxigênio (EROs)

produzidas pelo *burst* respiratório por meio do ensaio calorimétrico baseado na redução do corante Nitroblue Tetrazolium (NBT) que formam grânulos de formazan, que são precipitados de material insolúvel e apresentam coloração escuro no interior dos fagócitos (KLEIN, 1990).

Uma alíquota de 0,1 mL de sangue heparinizado foi colocada em tubos com 0,1mL de NBT (Sigma, St. Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 min em 25°C. Após esse período, 50 µL da suspensão formada foi colocada em tubos de ensaio com 1 mL de n,n-dimetil-formamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF produz a lise da parede celular dos grânulos de formazan e assim libera na solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectro em comprimento de onda de 540 nm (SAHOO et al., 2005).

4.8. Migração de fagócitos

Ao final do experimento, seis peixes de cada tratamento foram utilizados para a determinação da migração de fagócitos. Para tanto, foram injetados 1 mL de solução contendo levedura, *Sacharomyces cerevisiae* na concentração de 8.000 células. mm⁻³ na cavidade celomática dos peixes. Após o período de duas horas de incubação, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (1g L⁻¹) e eutanasiados por secção da medula espinhal (porção cervical). Realizou-se uma incisão ventral, por onde foi realizado o lavado da cavidade peritoneal com 1 mL de solução salina a 0,7%. O líquido contendo as células fagocíticas foi aspirado com pipeta Pasteur e centrifugado a 1500 rpm (251.5 x g) por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o restante depositado entre

lâmina e lamínula e observado ao microscópio de contraste de fase (400 X) para contagem do número de fagócitos . Com os resultados da contagem de fagócitos ativos e do total de leveduras no interior das células fagocíticas foram calculados a Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) segundo a metodologia descrita por SILVA et al. (2002) e SILVA et al. (2005). Os índices foram calculados conforme as fórmulas:

a) **Capacidade Fagocítica** = $\frac{\text{Número de fagócitos ativos}}{\text{Número total de células}} \times 100$ %

b) **Índice Fagocítico** = $\frac{\text{Número de fagócitos ativos}}{\text{Número total de células}} \times 100$ =

4.9. Desafio por *Aeromonas hydrophila*

As cepas de *Aeromonas hydrophila* utilizadas no desafio bacteriano dos pacus foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). A cepa foi armazenada à -70°C até o seu uso. Para o preparo do material para o desafio, a bactéria *A. hydrophila* foi semeada em TSB (caldo tripton de soja) e incubada por 24 horas em estufa bacteriológica à 25°C.

Para a realização do desafio bacteriano com *A. hydrophila*, foram conduzidos ensaios de DL₅₀, dose letal que causa a morte de 50 % dos animais, seguindo a metodologia descrita por PLUMBER e BOWSER (1986), utilizando a concentração de

10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} unidades formadoras de colônias em peixes, sendo estabelecida a concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ UFC.

Após 60 dias de suplementação de probiótico em dietas de pacus, os animais foram anestesiados (100mg L^{-1} de benzocaína) e submetidos à situações estressantes de manejo de captura como estresse por captura com puçá e estresse por exposição aérea durante 5 minutos e 3 minutos, respectivamente. Em seguida realizou-se em 20 peixes de cada tratamento a inoculação da bactéria, por meio de injeção intraperitoneal na concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ UFC de *A. hydrophila*.

Foram observadas a taxa de mortalidade e os sinais clínicos de aeromoníase a cada 12 horas durante 15 dias, após o desafio bacteriano. O diagnóstico da infecção por *A. hydrophila* foi realizado por meio de isolamento de *A. hydrophila* em cultura pura do rim cefálico e/ou observação de sinais clínicos: petéquias ao longo de toda a superfície corporal; ascite; peixes isolados; coloração enegrecida e hemorragia nas nadadeiras e nos órgãos internos.

4.9. Análise estatística

Os resultados dos parâmetros zootécnicos, hematológicos, imunológicos, bioquímicos e de qualidade de água nos diferentes tratamentos foram submetidos ao programa S.A.S 9.2 e realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan para valores de F que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), segundo ZAR (1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desempenho produtivo

Os juvenis de pacus alimentados com diferentes níveis de inclusão de *B. subtilis* e *B. cereus* não apresentaram diferença ($p > 0,05$) nos parâmetros de desempenho zootécnicos avaliados (Tabela 1). Portanto, em relação aos parâmetros produtivos avaliados no presente trabalho, a suplementação com probiótico não influenciou o ganho de peso diário, a conversão alimentar aparente, o consumo, a taxa de crescimento específico e o índice hepatossomático. Não foi observada mortalidade em nenhum dos grupos durante o período experimental.

Os valores médios do índice hepatossomático não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) e foram semelhantes aos descritos por TAVARES- DIAS et al. (2000) para juvenis de pacus. A uniformidade dos valores entre os tratamentos demonstra que os animais mantiveram-se em estado de hígidez, já que esses valores quando apresentam-se menores estão associados à necessidade dos animais em gastar suas reservas energéticas para a manutenção da homeostasia. Por outro lado, o aumento desse índice está relacionado ao fornecimento de dieta desbalanceada e inadequada (TAVARES- DIAS et al., 2007).

Esses resultados assemelham-se com os obtidos por NAKANDAKARE (2010) e CARVALHO et al. (2011) que forneceram dietas com 4 g kg^{-1} de *Bacillus subtilis* para juvenis de tilápias do Nilo durante 63 dias e 70 dias respectivamente. Assim como GUNTHER E JIMÉNEZ-MONTEALEGRE (2004) que forneceram *B. subtilis* para tilápia e camarão (*Macrobrachium rosenbergii*), não observaram efeitos benéficos sobre

os parâmetros de desempenho produtivo dos animais suplementados. Nenhum efeito sobre a performance de crescimento com a adição de *B. subtilis* na água de tanques de tilápias foi observada por ZHOU et al (2009).

1 **Tabela 1.** Valores médios e desvio- padrão do peso inicial (PMI), do peso final (PMF), do ganho de peso (GP), do ganho de peso diário (GPD), do consumo da dieta,
 2 da conversão alimentar (CA), da taxa de crescimento específico (TCE) e do índice hepatossomático (IH) de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*)
 3 alimentados com dietas suplementadas com níveis de probióticos *B. cereus* e *B. subtilis* durante 60 dias.

Tratamentos	PMI (g)	PMF (g)	GP (g)	GPD (g.dia ⁻¹)	Consumo (kg)	CA (g)	TCE (cm)	IH
Controle	64,80± 9,19	140,09 ± 7,28	75,29 ± 1,95	1,25 ± 0,03	2,50 ± 0,08	1,99 ± 0,10	1,29 ± 0,13	1,53±0,13
2g.kg ⁻¹	64,02 ± 9,06	136,09 ± 14,15	72,07 ± 6,77	1,20 ± 0,11	2,51 ± 0,11	2,10 ± 0,11	1,26 ± 0,09	1,52±0,21
4g.kg ⁻¹	72,49 ± 4,77	131,10 ± 12,04	58,60± 15,52	0,97 ± 0,25	2,56 ± 0,03	2,79 ± 0,84	0,98 ± 0,24	1,47±0,19
8g.kg ⁻¹	66,5 ± 5,74	134,14 ± 13,22	67,64 ± 8,75	1,12 ± 0,14	2,39 ± 0,16	2,14 ± 0,25	1,16 ± 0,08	1,55±0,24
16g.kg ⁻¹	68,15 ± 9,66	133,05 ± 14,92	64,89 ± 7,40	1,08 ± 0,12	2,57 ± 0,02	2,39 ± 0,25	1,11 ± 0,10	1,60±0,20

4 Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos para qualquer das variáveis apresentadas.
 5

No entanto, DIAS et al. (2012) ao avaliar reprodutores de matrinxãs (*Brycon amazonicus*) observou, após 83 dias de suplementação com *Bacillus subtilis* (5 g kg⁻¹ e 10g kg⁻¹), melhoria nos parâmetros de desempenho, tais como: melhor conversão alimentar aparente, maior taxa de crescimento específico e ganho de peso. Do mesmo modo, SON et al. (2009) obtiveram maiores valores de desempenho zootécnico com as maiores doses de probiótico e, em experimento semelhante, ALY et al. (2008) observaram que a interação de *B. subtilis* e *Lactobacillus acidophilus* apresentou-se como uma estratégia interessante para um melhor desempenho produtivo de tilápia do Nilo.

As diferentes respostas observadas para os parâmetros produtivos em estudos com probióticos pode ser atribuída às diferentes condições experimentais. Em organismos aquáticos, a constante interação com o meio resulta na maior dependência dos fatores ambientais, tais como qualidade da água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH e microflora ambiental) no estabelecimento, proliferação e função do probiótico no trato digestivo do hospedeiro (DAS et al., 2008; MEHRIM, 2009).

No presente estudo, o período experimental de sessenta dias, aos quais os peixes foram submetidos pode ser considerado curto, não promovendo a expressão do desempenho produtivo. Em adição, deve-se considerar diferenças inter-específicas, inerente aos aspectos fisiológicos da espécie estudada frente ao probiótico utilizado.

5.2. Isolamento e quantificação dos probióticos *B. cereus* e *B. subtilis*

Os resultados das análises microbiológicas realizadas a partir das rações experimentais que foram suplementadas com o probiótico estão relacionados na tabela 2. Observa-se o aumento do número de bactérias conforme o aumento da dosagem.

Tabela 2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC g⁻¹) de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* incorporadas na dieta de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) realizadas antes do início do experimento

Tratamentos	Ração experimental
0 g kg ⁻¹	1,6 x 10 ¹
2 g kg ⁻¹	1 x 10 ⁵
4 g kg ⁻¹	7 x 10 ⁵
8 g kg ⁻¹	4,2 x 10 ⁶
16 g kg ⁻¹	1,2 x 10 ⁷

A contagem de unidades formadoras de colônias de *Bacillus subtilis* recuperadas do intestino do pacu mostrou que a concentração de 2 g kg⁻¹ apresentou maiores valores em relação às demais concentrações (Figura 1A), porém sem diferença significativa entre os diferentes níveis de suplementação (p>0,05) durante os 60 dias de alimentação.

Todavia, o grupo controle apresentou os menores valores de *B. subtilis* (p<0,05) como esperado, uma vez que este não recebeu a ração acrescida do probiótico. Com relação ao período de alimentação dos pacus com as rações suplementadas com diferentes níveis de probiótico (Figura 1B), observou-se maior recuperação de *B. subtilis* no trato intestinal dos peixes após 7 e 15 dias de alimentação.

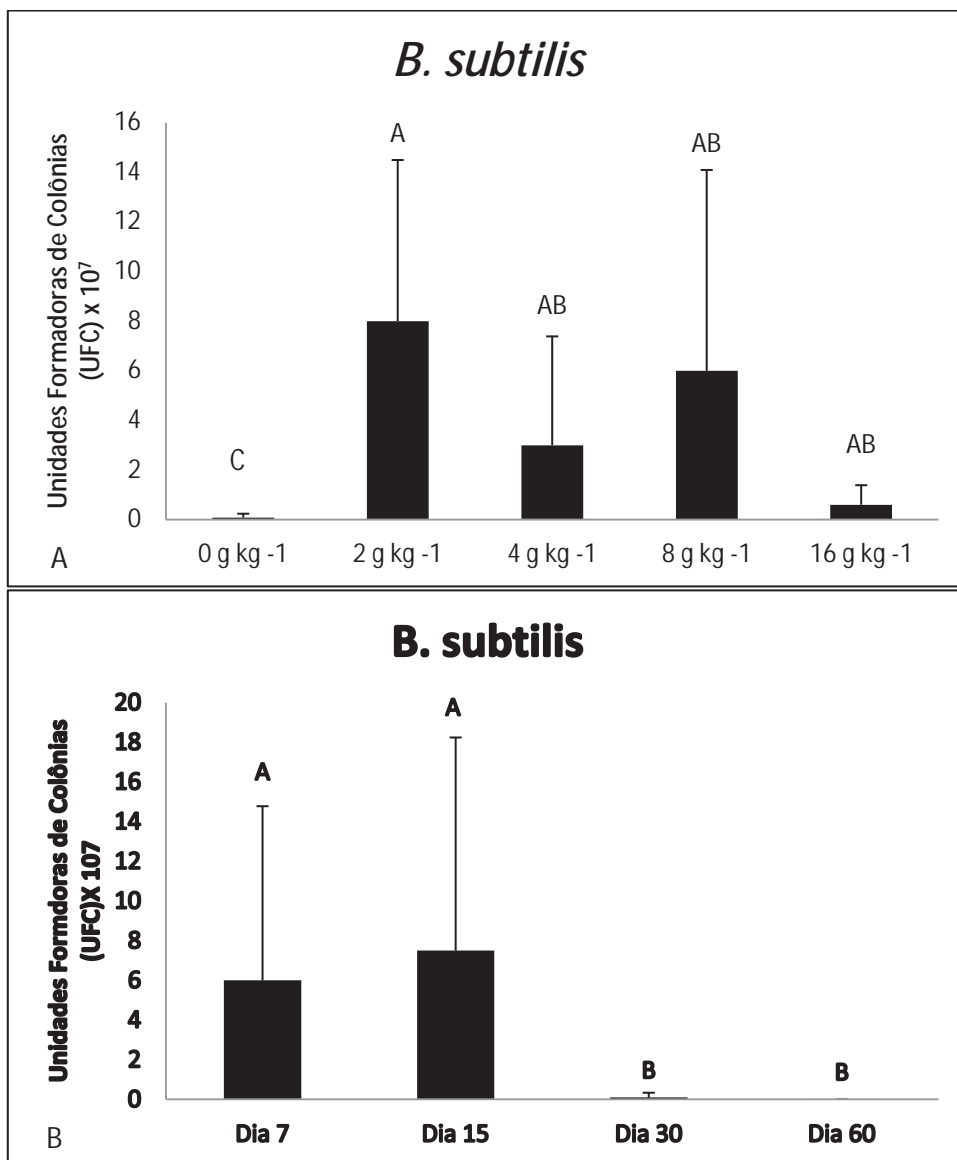


Figura 1. Unidades formadoras de colônias de *Bacillus subtilis* (UFC) isoladas do intestino de pacu após alimentação com diferentes níveis de inclusão do probiótico (A) durante 60 dias (B). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Com relação à quantidade de *B. cereus* recuperada do intestino do pacu alimentados com dietas contendo diferentes concentrações da bactéria, foi observado que o maior número de colônias ocorreu na concentração de 8 g kg⁻¹, todavia sem diferir estatisticamente das demais concentrações ($p > 0,05$), exceto no grupo controle que apresentou os menores valores ($p < 0,05$), como já esperado (Figura 2 A). Este estudo também demonstrou que o melhor tempo de suplementação de pacus com a ração

contendo probiótico foi de sete dias. Nota-se ao observar a Figura 2B que com o passar do tempo o número de colônias de *B. cereus* isoladas do intestino do pacu foi sendo reduzida com o passar do tempo, todavia, sem diferença estatística entre os diferentes tempos analisados ($p>0,05$).

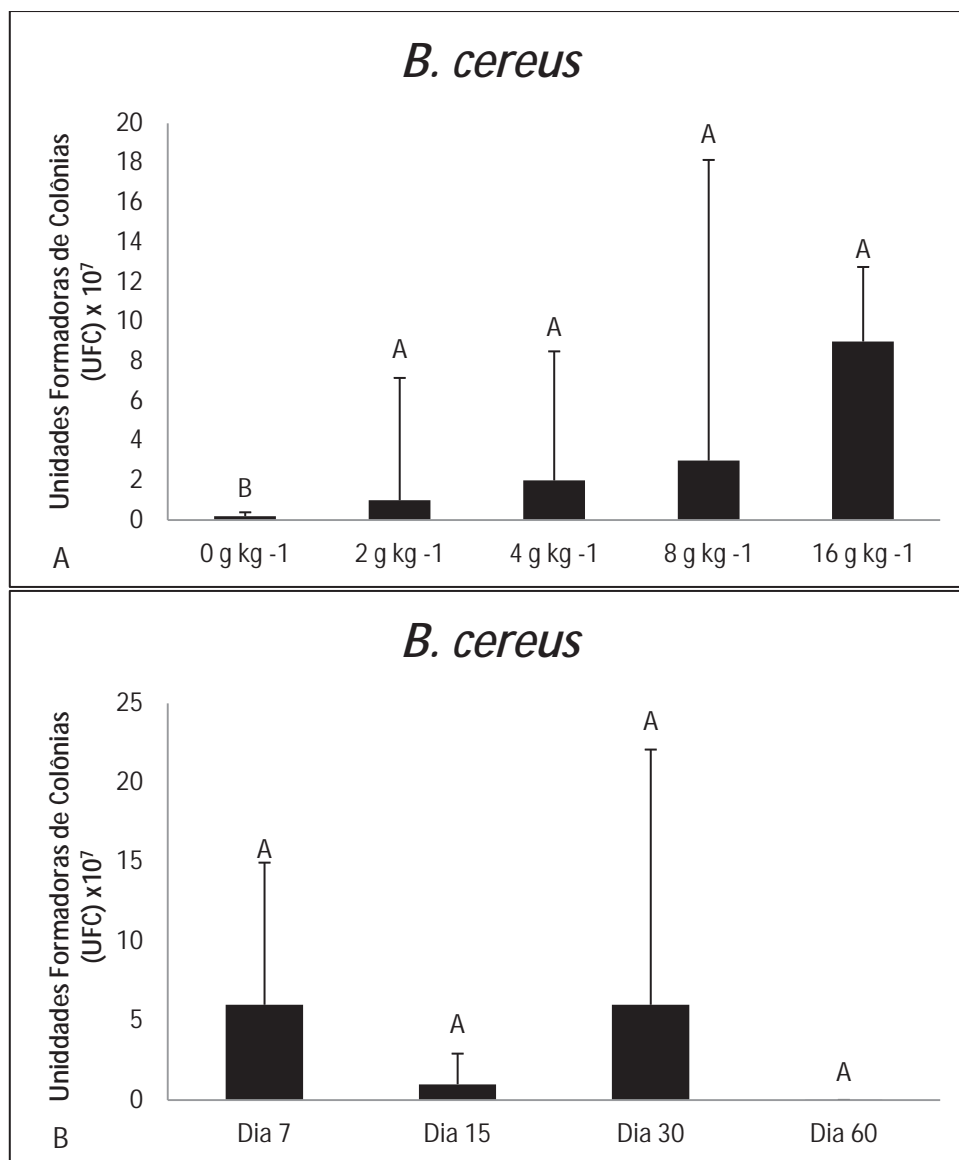


Figura 2. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bacillus cereus* isoladas do intestino de pacu alimentados com diferentes níveis de inclusão de probiótico (A) durante 60 dias (B). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p<0,05$).

A microbiota intestinal regula vários aspectos do sistema imune inato e adaptativo, protegendo o hospedeiro de patógenos invasores. A colonização intestinal tem papel importante na estimulação do desenvolvimento do sistema imune e seu desequilíbrio tem sido associado à susceptibilidade a infecções e desordens imunes, quando ocorre um predomínio das bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas (ALMEIDA et al., 2008; WALKER, 2008).

Neste estudo, todos os níveis de inclusão do probiótico mostraram ser efetivos na colonização do intestino do pacu, pois de todos os níveis foram recuperadas uma boa quantidade de *B. subtilis*. Todavia, a inclusão de 2 g kg⁻¹ mostrou ser mais efetiva neste processo, pois a quantidade de *B. subtilis* recuperada foi muito maior que as demais.

Com relação ao tempo de alimentação dos pacus com as dietas suplementadas com diferentes níveis do probiótico, o período ideal observado neste estudo foi de sete dias.

Sabe-se que microbiota intestinal dos organismos aquáticos, ao contrário dos terrestres é constituída predominantemente por bactérias gram negativas (GÓMEZ-GIL et al., 2000), dentre elas *Aeromonas* spp, *Flavobacterium columnare*, *Plesiomonas* e *Enterobacterium*, responsáveis por um grande número de mortalidade em pacu e em outras espécies de peixes de água doce. A microbiota intestinal pode variar de acordo com o ambiente, escassez de nutrientes ou pelo uso de bactérias probióticas (GATESOUBE, 2008).

A microbiota intestinal de peixes de água doce é constituída, em sua grande maioria, por bactérias gram negativas. Neste trabalho foi observado que os peixes que receberam ração suplementada com os dois bacilos probióticos apresentaram colonização destas bactérias e passaram a apresentar grande população destes microorganismos no intestino, sugerindo que as bactérias probióticas podem agir na

prevenção de enfermidades, podendo favorecer a diminuição da carga bacteriana por exclusão competitiva ou produção de substâncias inibidoras, ou seja, exercendo efeito antagônico entre microorganismos benéficos e patogênicos (VERSCHUERE et al., 2000).

Os valores de colonização do intestino pelo probiótico obtidos neste estudo estão de acordo com os relatos de Carnevali et al. (2004), que verificaram a colonização do intestino de larvas de *sea bream* após o fornecimento de *L. fructivorans* e *L. plantarum*. Costa et al. (2004) também demonstraram que a inclusão de *S. cerevisiae* proporcionou a colonização do intestino da tilápia do Nilo durante a fase de reversão sexual.

5.3. Hematologia

Os resultados do eritrograma estão apresentados na Figura 3. Pode-se observar maiores valores de hematócrito ($p < 0,05$) no grupo controle que, por sua vez, não diferiu estatisticamente da coleta basal (momento zero) e do grupo tratado com 16 g kg^{-1} (Figura 3A). No número de eritrócitos foram observados maiores valores no grupo que recebeu 4 g kg^{-1} de suplementação ($p < 0,05$), no entanto, este valor apresentou diferença apenas dos valores basais (Figura 3B). Na taxa de hemoglobina, os maiores valores foram encontrados nos grupos que receberam menores doses de suplementação com probiótico, assim como dos animais que não receberam a suplementação (controle). No entanto, o menor valor de hemoglobina ($p < 0,05$) foi observado na coleta basal (Figura 3C). No volume corpuscular médio (VCM) não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos e coleta basal, no entanto, os tratamentos com 4 e 8 g kg^{-1} , além dos valores basais, apresentaram menores valores ($p < 0,05$) em relação ao

controle (Figura 3D). A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi superior ($p < 0,05$) nos grupos suplementados 2 e 4 g kg⁻¹ de probiótico, sendo registrado os menores valores na coleta basal (Figura 3E). A concentração de proteína plasmática não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos (Figura 3F).

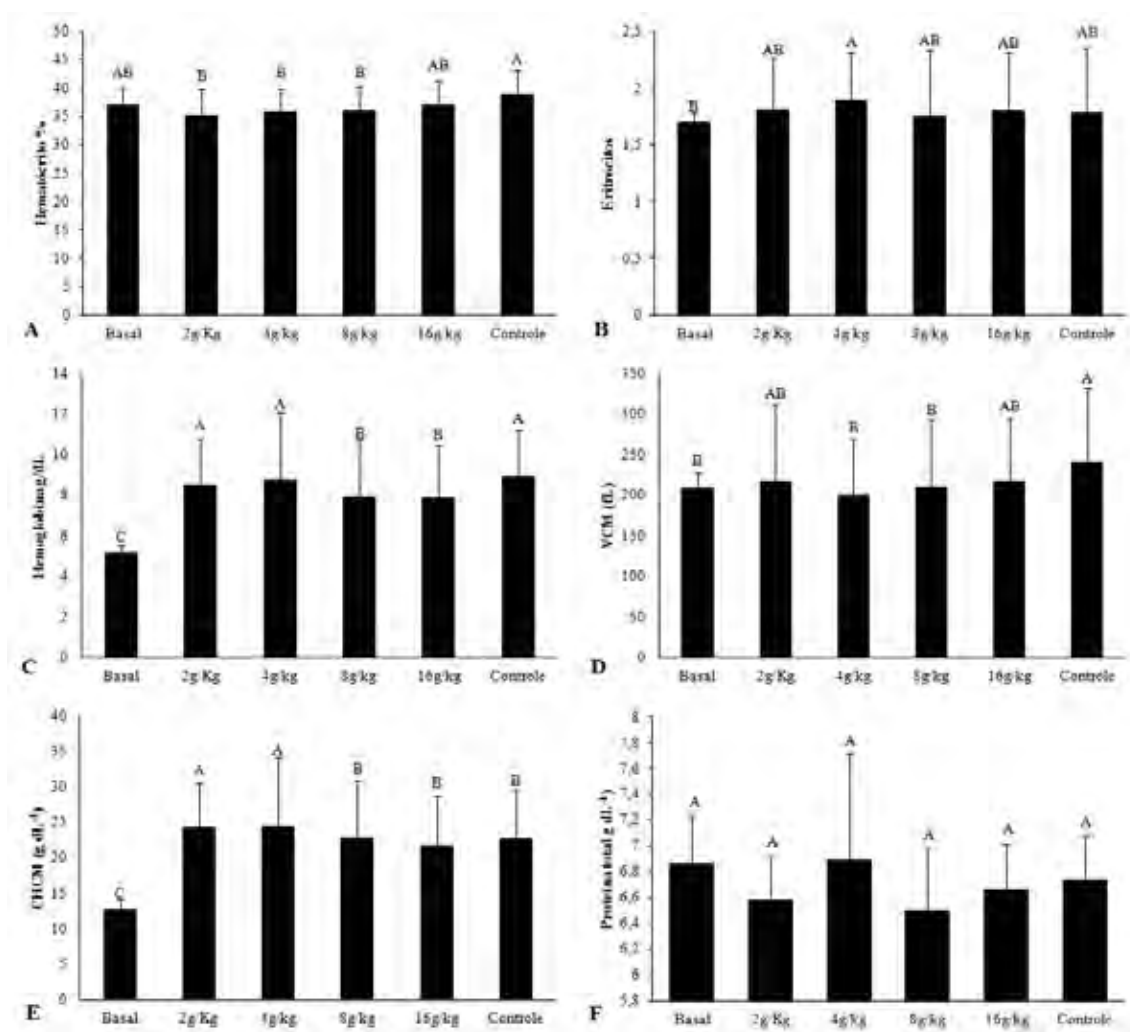


Figura 3. Eritrograma e proteínas totais do plasma de juvenis de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

A avaliação dos parâmetros hematológicos dos peixes, como hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média e volume de

hemoglobina corpuscular média avaliam a capacidade dos animais em responder à demandas energéticas em situações adversas e conseqüentemente a avalia seu estado fisiológico. A suplementação com probiótico na alimentação de peixes pode determinar diferentes respostas no eritrograma. ALY et al. (2008), diferentemente a este estudo, observaram o aumento do hematócrito em tilápia suplementadas com *L. acidophilus* e *B. subtilis*. Por outro lado, MERRIFIELD et al. (2010) não encontraram diferenças neste parâmetro ao suplementar truta arco-íris com *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *Enterococcus faecium*. BRUNT e AUSTIN (2005), BRUNT et al. (2007), PIETERS et al. (2008) e MOURIÑO et al. (2011), de forma semelhante ao observado na suplementação de *Bacillus* em dietas de pacus, não verificaram diferenças no número de eritrócitos em peixes que receberam suplementação com diferentes bactérias probióticas incorporados na dieta, no entanto, MOURIÑO et al. (2011) verificaram que ao adicionar o probiótico associado a um prebiótico ocorre aumento do número de eritrócitos em surubim híbrido. Neste estudo, os maiores valores de eritrócitos foram observados no grupo suplementado com 4 g kg⁻¹ de probiótico, que foi diferente somente em relação à coleta basal (momento zero).

EL-RHMAN et al. (2009) observaram diminuição da taxa de hemoglobina em tilápia após 90 dias de suplementação com *Pseudomonas* sp. Neste estudo, apenas os níveis de suplementação com 8 e 16 g kg⁻¹ promoveram este efeito. Estes resultados são contrários aos observados por FIROUZBAKSHI et al. (2011) ao testar probiótico comercial composto por bactérias ácido lácticas e dos gêneros *Enterococcus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Streptococcus* sp, *Aspergillus* sp e *Candida* sp para alevinos de Oscar (*Astronotus ocellatus*). Estes mesmos autores também descreveram alterações nos índices hematimétricos em resposta às diferentes dosagens testadas, havendo diminuição do VCM e aumento do CHCM (FIROUZBAKSHI et al., 2011). Nossos

resultados foram similares aos de FIROUZBAKHSI et al. (2011) nos níveis de suplementação com 4 e 8 g kg⁻¹ para o VCM e 8 e 16 g kg⁻¹ para o CHCM.

Os valores de concentração de proteína plasmática encontrados neste trabalho, assemelham-se aos resultados obtidos por NAKANDAKARE (2010), MOURIÑO et al. (2011), porém diferindo de NAYAK et al. (2007), o qual observaram valores de proteína plasmática menores em animais suplementados com probiótico e/ou vitamina C. A avaliação deste parâmetro está associado à condição de higidez, metabolismo protéico e à condição nutricional dos animais (COLES, 1984). No nosso estudo, o fornecimento de probiótico não interferiu nos valores de proteína plasmática, demonstrando a manutenção da homeostasia dos fluidos corpóreos destes animais.

Diferentes bactérias probióticas, bem como diferentes dosagens empregadas e aspectos inerentes à fisiologia das espécies de peixes podem estar relacionadas a estas diferentes respostas no eritrograma. Como o hemograma é uma importante ferramenta para avaliar as condições de higidez dos peixes, os valores obtidos no presente estudo estão de acordo com dados previamente descritos para o pacu (RANZANI- PAIVA et al., 1998/1999; TAVARES- DIAS et al., 2003; MARTINS et al. 2001).

Os valores da glicemia e cortisolemia estão demonstrados na figura 4. Pode-se observar menores valores de glicose nos grupos tratados com 8 e 16 g Kg⁻¹ de probiótico (Figura 4A). Por outro lado, os níveis de cortisol permaneceram na mesma faixa entre os tratamentos, sendo superior apenas na coleta basal ($p < 0,05$) (Figura 4B). Os níveis de glicose apresentaram valores médios de 67,93 mg dL⁻¹, corroborando com os valores descritos para pacu por TAVARES-DIAS e MATAQUEIRO (2003), os quais encontraram valores com variação de 40,6 a 89,2 mg dL⁻¹. A glicemia não foi diferente quando comparado o controle com os demais tratamentos. Da mesma forma, o cortisol plasmático não apresentou diferença nos valores médios entre os diferentes tratamentos,

portanto não apresentando resposta ao estresse. Estes valores variaram de 8 a 14,63 $\mu\text{g dl}^{-1}$, apresentando valores superiores aos resultados descritos para a espécie por FUJIMOTO et al. (2005) e TAVARES-DIAS e MATAQUEIRO (2003), sendo 6,29 $\mu\text{g dl}^{-1}$ e 3,14 $\mu\text{g dl}^{-1}$, respectivamente.

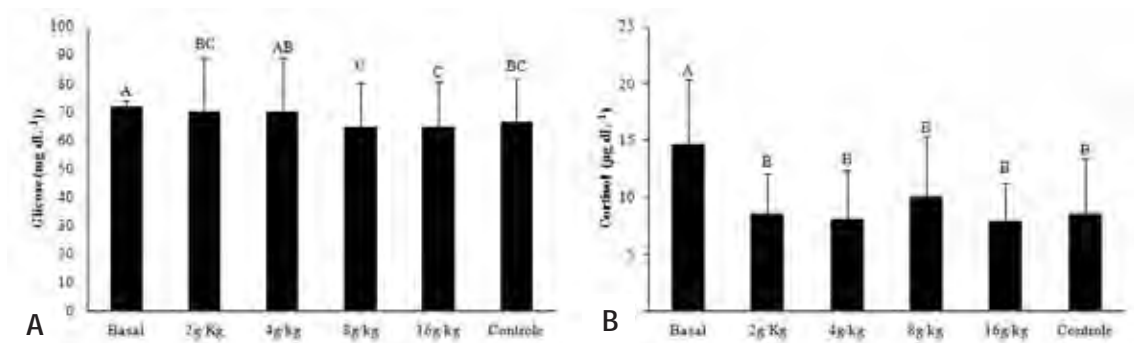


Figura 4. Glicemia e cortisolemia de juvenis de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Os resultados do trombograma e do leucograma estão relacionados na Figura 5. Pode-se observar que houve maior número de trombócitos no grupo controle, diferindo estatisticamente dos tratamentos com 2, 4 e 8 g kg^{-1} de probiótico, porém não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à coleta basal e ao grupo tratado com 16 g Kg^{-1} de probiótico (Figura 5A). Em relação à contagem de leucócitos e linfócitos, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) apenas da coleta basal que apresentou menor número destas células (Figuras 5B e 5E). O maior valor de monócito foi observado na coleta basal, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos, os quais não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre si (Figura 5C). Os neutrófilos, leucócitos imaturos e as células granulocíticas especiais não apresentaram diferença ($p > 0,05$) nos diferentes níveis de probiótico e na coleta basal (Figuras 5E, 5F e 5G). O maior número

de eosinófilos foi observado no tratamento com 4g kg⁻¹, havendo diferença (p < 0,05) em relação ao grupo suplementado com 2g kg⁻¹ de probiótico, o qual apresentou o menor número destas células (Figura 5H).

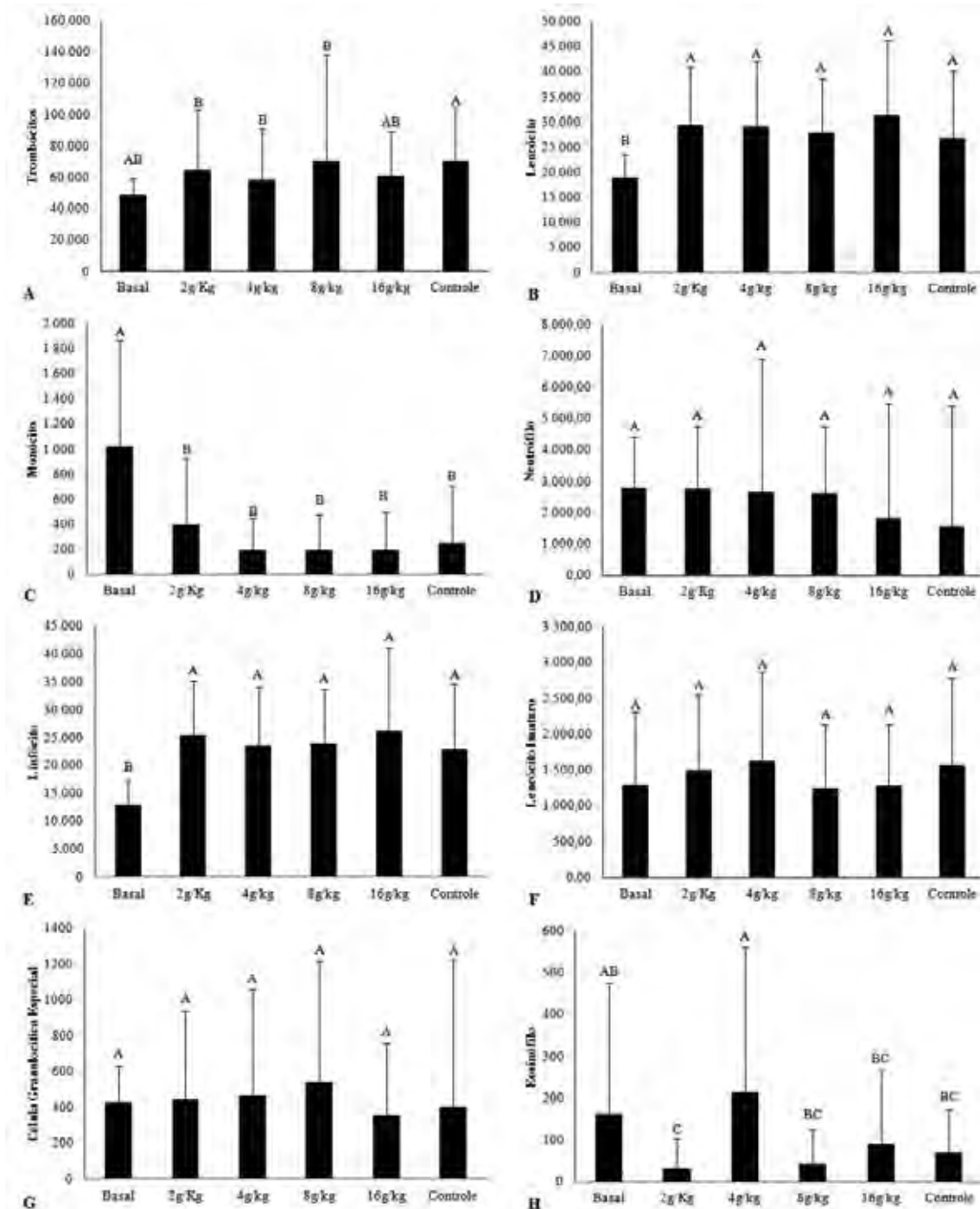


Figura 5. Trombograma (μL⁻¹) (A) e leucograma (μL⁻¹) (B-H) de juvenis de pacu (médias ± desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan (p < 0,05).

Os trombócitos de peixes são células verdadeiras, cuja função é semelhante às plaquetas de mamíferos, que está relacionada à coagulação sanguínea (TAVARES-DIAS et al., 2004). Além disso, a presença destas células nos processos inflamatórios, como descrito por MATUSHIMA e MARIANO (1996); MARTINS et al. (2000) e atividade fagocitária (AFFONSO, 2006) demonstra a participação desta célula nos mecanismos de defesa. Aumento nos valores de trombócitos foram descritos por FARAMARZI et al. (2011) ao suplementar a dieta de truta arco-íris com *L. acidophilus* durante 90 dias. Em nosso estudo foi observado efeito contrário, assim como DIAS et al. (2012) ao suplementar o mesmo probiótico para reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*). Os autores relatam que esse resultado pode estar associado ao período reprodutivo dos animais alimentados com probiótico. Os diferentes resultados podem estar relacionados ao período experimental, espécie de peixe estudo e tipo de bactéria utilizada.

Os leucócitos são células de defesa que atuam no organismo contra microorganismos invasores (SECOMBES, 1996). A avaliação desse parâmetro possibilita a identificação de processos infecciosos e outras alterações na homeostasia dos animais (MAHONEY e MACNULTY, 1992). Os valores de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos circulantes, seguiram o mesmo padrão observado por DIAS et al. (2012) ao suplementar *Bacillus subtilis* para matrinxã, pois também não houve diferença significativa no número destas células sanguíneas entre os animais dos diferentes tratamentos. Os resultados obtidos são semelhantes aos reportados por NAKANDAKARE (2010) ao suplementar juvenis de tilápia do Nilo com *B. subtilis*, pois também não foi observada diferença entre os tratamentos. Outros autores (MERRIFIELD et al., 2009; KUMAR et al., 2006) também não observaram alteração

nos níveis de leucócitos ao suplementar truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e carpa (*Labeo rohita*), respectivamente, com *B.subtilis*. Já RAIDA et al. (2003) não observou alteração dos valores de linfócitos. O aumento nos valores de eosinófilos no tratamento com 4 g kg⁻¹ pode ser uma alteração pontual, sem relação com a suplementação com o probiótico.

5.4. Migração de fagócitos

Os níveis de 4, 8 e 16 g kg⁻¹ de probiótico na alimentação de pacu proporcionaram aumento da capacidade fagocítica ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (0 g kg⁻¹) e 2 g kg⁻¹. Os animais submetidos ao tratamento com inclusão de 2 g kg⁻¹ de probiótico apresentaram menores valores de percentual de fagocitose (70,2%), porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos animais controle (0 g kg⁻¹) e diferiram ($p < 0,05$) dos animais submetidos às concentrações de 4, 8 e 16 g kg⁻¹ de probiótico. Portanto, os três maiores níveis de inclusão de *Bacillus* spp. em dietas para juvenis de pacus, proporcionaram maior capacidade dos fagócitos em fagocitar as leveduras inoculadas aos 60 dias de suplementação. Com relação ao tempo de administração deste probiótico, os valores de capacidade fagocítica não diferiram para os maiores níveis (4, 8 e 16 g kg⁻¹) após 60 dias quando comparados ao tempo zero ($p > 0,05$) (Figura 6).

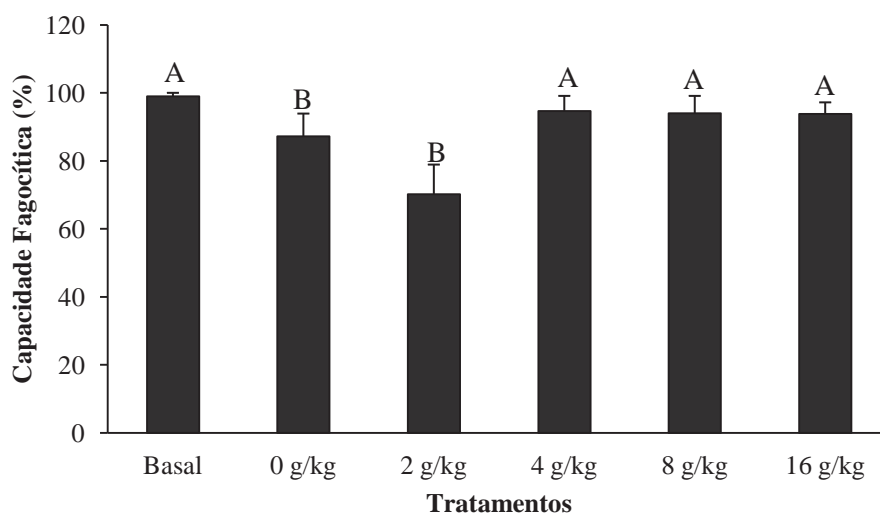


Figura 6. Capacidade fagocítica dos fagócitos celomáticos de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à dieta suplementada ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Os valores médios do índice fagocítico (IF) foram maiores ($p < 0,05$) nos animais alimentados com os níveis mais elevados de probiótico (8 e 16 g kg⁻¹) (Figura 7). Enquanto que a coleta basal e o grupo controle apresentaram os menores valores de índice fagocítico. Portanto, a inclusão de altos níveis de probiótico (8 e 16 g kg⁻¹) na alimentação de pacu proporcionou maior aporte de fagocitose de levedura no interior dos fagócitos celomáticos.

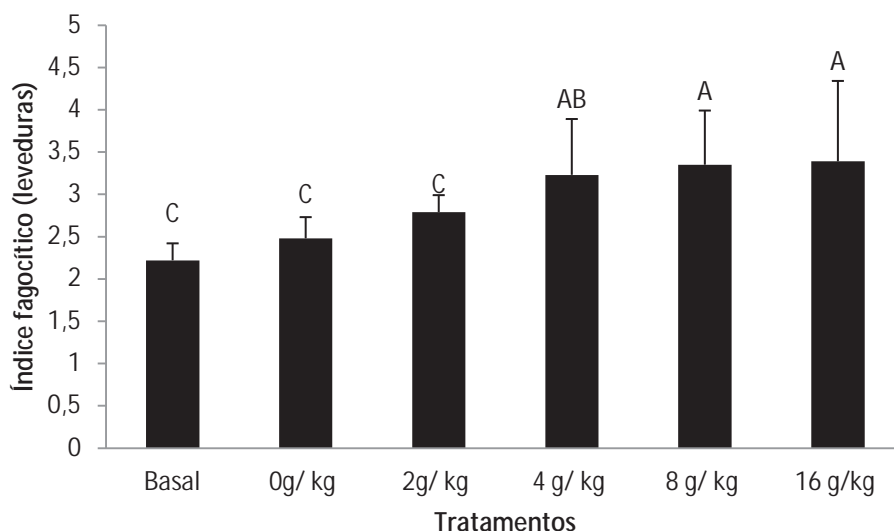


Figura 7. Índice fagocítico de fagócitos celomáticos de pacu (médias \pm desvio padrão) submetidos à suplementação ou não com probiótico. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

No presente estudo, os peixes alimentados com dietas com inclusão de maiores doses de probiótico (8 e 16g kg⁻¹) obtiveram resultados superiores em relação às doses de 2 e 4 g kg⁻¹ e ao grupo controle tanto para a capacidade fagocítica quanto para índice fagocítico ao final de 60 dias de suplementação. Com relação ao tempo de administração deste probiótico, os valores de índice fagocítico de fagócitos apresentaram diferença significativa para os maiores níveis (8 e 16 g kg⁻¹) após 60 dias quando comparados ao tempo zero ($P < 0,05$) (Figura 7).

A atividade fagocítica das células de defesa é um mecanismo de resposta imune não específica contra patógenos. A modulação da atividade fagocítica é um dos efeitos mais observados e imediatos do microorganismo probiótico sobre o sistema imunológico tanto em animais superiores na escala evolutiva quanto em peixes (GENG et al., 2011)

Diversos autores relataram o aumento da atividade fagocítica em peixes suplementados com probiótico (MARZOUK et al, 2008., PIETERS et al, 2008.,

IRIANTO e AUSTIN., 2002, 2003). A capacidade e índice fagocítico para os níveis de inclusão estudados diferiram dos resultados observados por SON et al. (2009) que alimentaram *Epinephelus coioides* durante quatro semanas com rações suplementadas com *Lactobacillus plantarum*. Os animais suplementados apresentaram significativo aumento da capacidade e índice fagocítico quando comparados ao grupo controle após duas e quatro semanas de suplementação e após quatro semanas respectivamente, porém não observaram diferença significativa desses parâmetros nas diferentes doses utilizadas. Assim como foram relatados para truta arco-íris por PANIGRAHI et al. (2004) e BRUNT et al. (2005) que também não observaram influência das diferentes doses de probióticos sobre o aumento do aporte fagocítico.

Os resultados positivos da suplementação com a bactéria probiótica *Bacillus subtilis* sob o efeito estimulador na migração de fagócitos em peixes é relatado por diversos autores, como DIAS et al (2012) ao adicionar 10 g de probiótico por kg⁻¹ em ração de reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*) demonstrando efeito positivo na resposta imunológica dos animais suplementados. Nakandakare (2010), incorporando a dose de 4 gramas de *B.subtilis* e *B.cereus* por kg de ração para tilápias durante 63 dias, apresentou aumento da capacidade fagocítica, assim como os resultados deste trabalho, o qual obteve-se diferença significativa para o mesmo nível de inclusão. Estes autores não observaram diferença no índice fagocítico dos animais suplementados em relação ao grupo controle, contrapondo aos encontrados neste presente estudo, nos quais os animais que receberam 8 e 16 g de probiótico por kg⁻¹ deste probiótico apresentaram diferença nos valores deste parâmetro.

SALINAS et al., (2005) também utilizaram *Bacillus* sp. como probiótico e obtiveram resultados superiores de capacidade e índice fagocítico em relação ao grupo controle ao final de 15 dias de suplementação em juvenis de dourada (*Sparus aurata*),

porém ao cessar a suplementação por período de uma semana houve diminuição da atividade fagocítica atingindo valores semelhantes aos observados no grupo controle. Outros estudos demonstraram eficácia de *B. subtilis* para o controle de doenças bacterianas em truta arco-íris após 15 dias de suplementação, nos quais observaram aumento da atividade fagocítica e de outros parâmetros de imunidade não específica (NEWAJ-FYZUL et al., 2007; BRUNT et al., 2007). No presente estudo foi observado que a suplementação deste probiótico durante 60 dias proporcionou uma melhora no recrutamento e na atividade fagocítica de pacus.

Os resultados encontrados neste estudo podem estar relacionados com as bactérias do gênero *Bacillus* que são consideradas ativadoras da resposta imune não específica segundo COPPOLA e GIL-TURNES (1994), por meio da ação de mediadores que promovem a ativação das células fagocíticas como descrito por CROSS (2002). É importante ressaltar que a interação de bactérias probióticas com a mucosa do tecido linfóide intestinal ocorre por meio da interação de receptores *toll-like*, moléculas de superfície presentes nas células de defesa localizadas na mucosa intestinal, com as moléculas associadas à estas bactérias. Esta interação promove a ativação da resposta imunológica, por meio da liberação de citocinas (interleucinas e interferons), que irão promover o recrutamento de macrófagos para o local da infecção (PÉREZ et al., 2010).

5.5. Atividade respiratória dos leucócitos- *Burst* respiratório

No presente trabalho, os animais apresentaram aumento da atividade respiratória de leucócitos em todos os tratamentos, de acordo com o aumento do tempo de

suplementação com o probiótico ($p < 0,05$) (Figura 8A), entretanto não houve diferença significativa entre os níveis de suplementação ($p > 0,05$) (Figura 8B).

A atividade respiratória dos leucócitos demonstra a capacidade dos fagócitos em produzir espécies reativas de oxigênio, com o objetivo de atacar os patógenos invasores durante o processo de fagocitose, atuando sobre as membranas e destruindo os agentes invasores (BASHEERA-JOHN et al., 2002), portanto o aumento deste parâmetro em todos os níveis de probióticos inclusos na ração, mesmo sem diferença estatística sugere a melhora do sistema imunológico.

Diversos autores não observaram a influência do uso de probióticos na atividade respiratória dos leucócitos de peixes, corroborando com os resultados observados neste estudo (PANIGRAHI et al., 2004; NAYAK et al., 2007; SHARIFUZZAMAN et al., 2009; DÍAZ-ROSALES et al., 2009, PIETERS et al., 2008).

NAYAK et al. (2007) ao estudar o efeito da suplementação de *Bacillus subtilis* sobre a resposta imune de carpa (*Labeo rohita*) não observaram diferença significativa em relação ao grupo controle após sessenta dias de alimentação, assim como, QINGHUI AI et al. (2011) que forneceram *Bacillus subtilis* para juvenis de *Larimichthys crocea* durante 10 semanas. Porém, em ambos os trabalhos houve diferença significativa em relação aos animais não suplementados, quando foram fornecidos *B. subtilis* em combinação com a vitamina C e com o prebiótico frutoligossacarídeo, respectivamente. Essa interação entre probióticos e outros imunoestimulantes pode promover o aumento da atividade respiratória dos leucócitos.

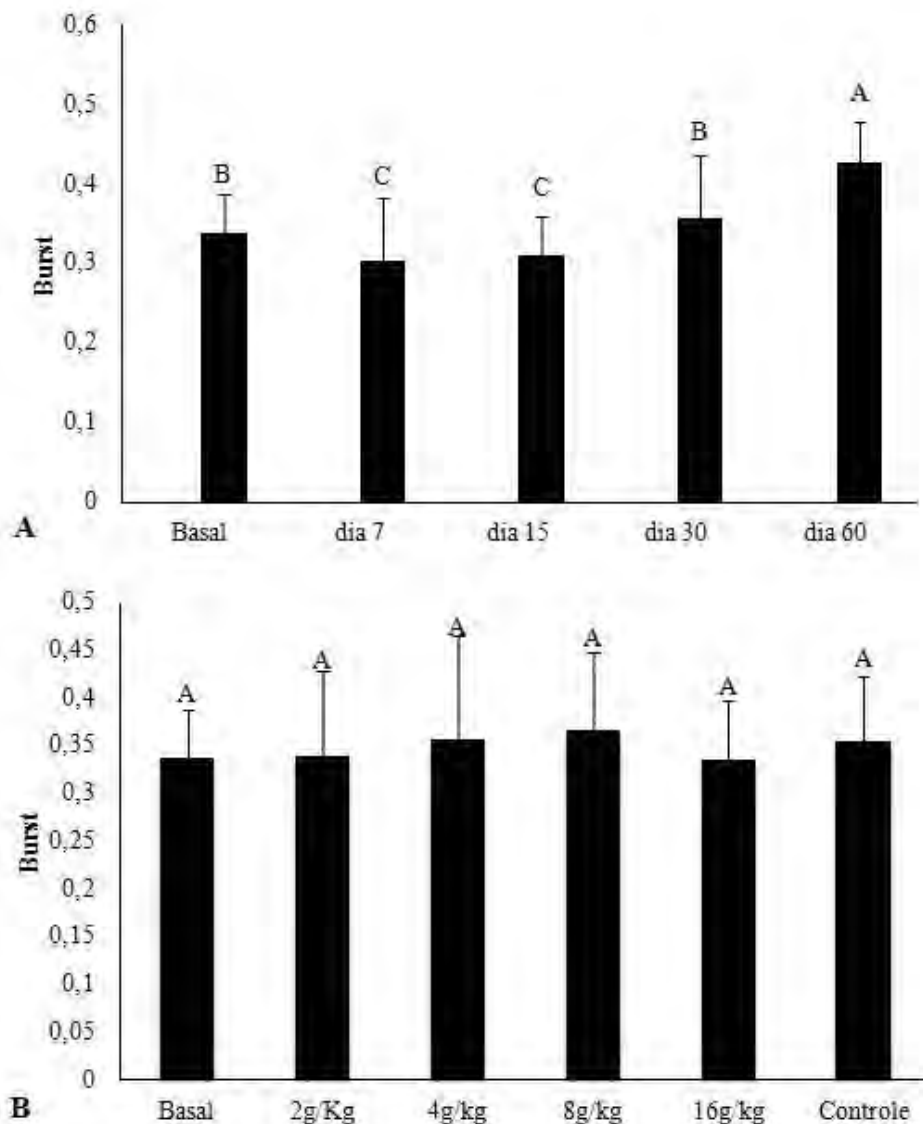


Figura 8. Atividade respiratória de leucócitos de sangue de pacu (médias ± desvio padrão) alimentados com diferentes níveis de inclusão de probiótico durante 60 dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Em contrapartida, alguns autores já descreveram aumento da atividade respiratória dos leucócitos em animais suplementados com bactérias probióticas do gênero *Bacillus subtilis* e algumas do grupo ácido lácticas (NIKOSKELAINEN., 2003; SALINAS et al., 2005, 2006; ZHOU et al., 2009). SON et al. (2009) ao fornecer diferentes doses de *Lactobacillus plantarum* para o peixe marinho *Epinephelus coiodes* durante 4 semanas de suplementação também observaram maiores valores médios no

decorrer do tempo, porém sem diferença significativa entre as diferentes doses fornecidas aos animais, como no presente trabalho.

ALY et al. (2008) observaram aumento dos valores de *burst* respiratório no período de dois meses de suplementação com *B. subtilis* e *Lactobacillus plantarum*, juntos e/ou isolados, quando fornecidos à tilápia do Nilo, assemelhando-se aos resultados observados no presente estudo em relação ao tempo, onde houve aumento significativo destes valores ao final de um mês e mantendo-se até o final do período experimental (60 dias).

NIKOSKELAINEN (2003) ao suplementar truta arco-íris com diferentes doses de *Lactobacillus rhamnosus* e observando o aumento do *burst* respiratório aos 15 dias de experimento, porém ao cessar a suplementação por uma semana, os animais atingiram níveis semelhantes de atividade respiratória de leucócitos quando comparados ao grupo controle.

Segundo NAYAK (2010), os resultados encontrados para esse parâmetro são frequentemente contraditórios para peixes, sendo associados às diferentes doses de probióticos utilizadas e período de suplementação (KUMAR et al., 2008; PANIGRAHI et al., 2004, PANIGRAHI et al.2005), além de diferenças fisiológicas inter-específicas.

A atividade respiratória dos leucócitos é um importante mecanismo de defesa inata dos peixes, assim como a atividade fagocítica das células fagocíticas, que podem estar correlacionados como observados por SON et al (2009). No entanto, neste trabalho esta correlação não foi observada já que houve aumento da atividade fagocítica nos grupos suplementados com as maiores doses de probiótico enquanto que não houve diferença na atividade respiratória de leucócitos. Este fato pode ser atribuída à fatores como o probiótico fornecido atuar em sítios diferentes do sistema imune do hospedeiro ou períodos de suplementação diferentes (QINGHUI AI et al., 2011).

Resultados semelhantes foram observados por PANIGRAHI et al (2004) ao alimentar truta arco-íris com dieta suplementada com *Lactobacillus rhamnosus* durante 30 dias e PIETERS et al (2008) ao utilizar como probiótico a bactéria *Aeromonas sobria* na dieta de truta arco-íris durante 14 dias.

O efeito imunomodulador de *B.subtilis* e *B.cereus* observado no presente estudo, sugere que a atuação deste probiótico na espécie em questão, atua no incremento da atividade de células fagocíticas do pacu.

5.6. Desafio por *Aeromonas hydrophila*

Os pacus alimentados com dieta sem incorporação de probiótico apresentaram maior taxa de mortalidade em relação aos animais alimentados com dieta com diferentes níveis de inclusão de probiótico após o desafio com *A. hydrophila*, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos suplementados e não suplementados com probiótico. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos suplementados com diferentes doses de probiótico.

O aparecimento dos sinais clínicos como isolamento dos peixes, petéquias, ascite e hemorragia foram observados 24 horas após o desafio, seguido de morte entre 48 e 96 horas da inoculação com a bactéria patogênica.

Vários autores já relataram os efeitos positivos da administração de probióticos como promotor do aumento da resistência de diversas espécies de peixes contra patógenos bacterianos (BRUNT e AUSTIN, 2005; VENDRELL et al., 2008;

SHARIFUZZAMAN et al., 2009; GILBERG et al., 1995; VIJAYABASKAR et al., 2008), protozoários como *Ichthyophthirius multifiliis* (PIETERS et al., 2008) e vírus (SON et al., 2009). No entanto, HE et al. (2011) não observaram aumento da resistência de carpas à infecção por *A. hydrophila* após 60 dias de suplementação de *B. subtilis* na dieta.

Neste estudo, observou-se diminuição crescente da taxa de mortalidade com o aumento do nível de inclusão de probiótico na ração de pacus, enquanto que nos animais não suplementados com probiótico na dieta houve mortalidade de 60%, diferindo significativamente dos animais alimentados com probiótico na dieta (Figura 9).

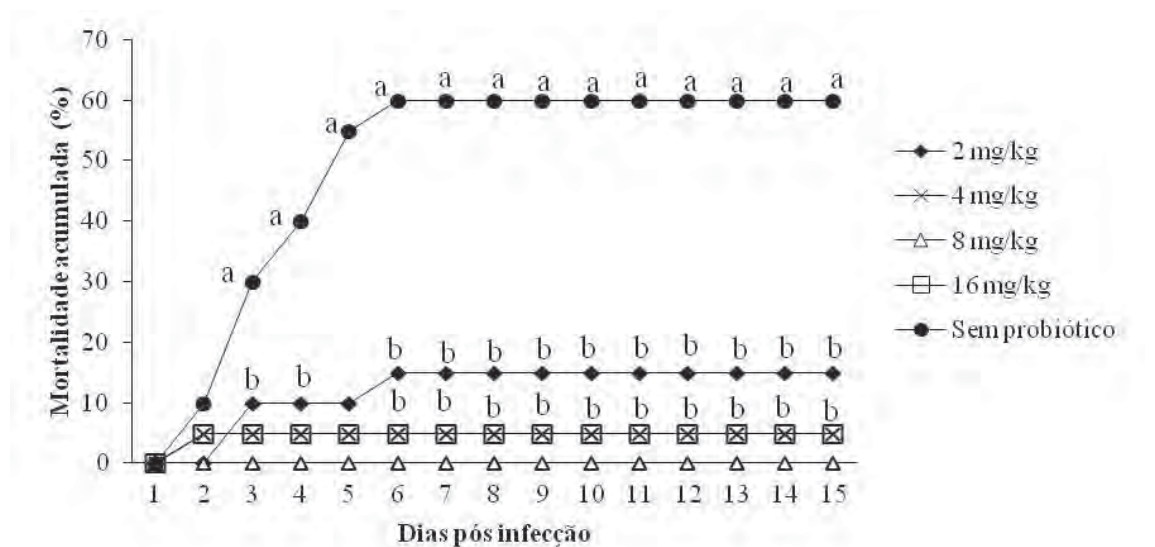


Figura 9. Mortalidade acumulada (%) de pacus submetidos à dieta suplementada com probiótico por 60 dias, após desafio com *Aeromonas hydrophila*. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Em estudo semelhante, NEWAJ-FYZUL et al (2007) ao fornecer dietas com *B.subtilis* para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) observaram controle da taxa de mortalidade após desafio com *Aeromonas*, associado ao aumento do número de leucócitos e maiores valores de *burst* respiratório e atividade fagocítica. Assim como ALY et al. (2008) e RAIDA et al. (2003) ao suplementar truta arco-íris e tilápia, respectivamente, com dieta com incorporação de *B.subtilis*. Estes autores observaram as menores taxas de mortalidade após o desafio com bactérias patogênicas, associados com aumento dos valores de hematócrito, *burst* respiratório e lisozima. Os resultados do presente estudo sugerem que as maiores doses de probiótico incorporadas na ração de pacus (8g kg^{-1} e 16g kg^{-1}) promoveram a melhoria da imunidade não específica, observada por meio dos maiores valores de capacidade e índice fagocítico em relação aos outros grupos e conseqüentemente proporcionaram maior proteção dos pacus infectados por *A. hydrophila*, que apresentaram 100% e 95% de taxa de sobrevivência, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

A administração de probiótico em dietas de pacus não influenciou na melhora do desempenho produtivo e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados.

Foi possível recuperar as bactérias probióticas no intestino em grande quantidade, principalmente nos primeiros dias de suplementação de probiótico na dieta de pacus, assim possibilitando o aumento desta população de bactérias na microbiota intestinal em detrimento à colonização de bactérias patogênicas. Além disso, observou-se que a administração de 8 e 16g Kg⁻¹ de probiótico durante 60 dias proporcionou a melhora da capacidade e índice fagocítico, assim como as maiores taxas de sobrevivência após o desafio por *A. hydrophila*. Entretanto, devem ser realizados novos estudos sobre a influência do probiótico sobre os parâmetros produtivos e fisiopatológicos de pacus, bem como o aperfeiçoamento de protocolos de utilização deste produto.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de probióticos e outros produtos que visam a melhoria das condições de higiene dos organismos aquáticos é uma alternativa promissora na aquicultura. Isso ocorre, especialmente, pelo fato de poder atuar como substituto à utilização de antimicrobianos, que hoje são utilizados de forma indiscriminada.

Diferentes estudos sobre a utilização de probióticos em peixes apresentam muitas vezes resultados controversos, com diferentes respostas nos parâmetros produtivos e fisiopatológicos. Isso pode estar relacionado a diferentes espécies de bactérias utilizadas como probiótico, além disso, temos que considerar que algumas são isoladas do trato gastrointestinal da mesma espécie de peixe em estudo, e outras são oriundas de outros animais. Em adição, o tempo de suplementação, bem como diferentes doses testadas e diferentes espécies de peixes utilizadas podem causar essas divergências.

B. cereus e *B. subtilis* utilizados neste estudo colonizaram o trato gastrointestinal de pacu. No entanto, estas bactérias não proporcionaram melhorias nos parâmetros produtivos, apenas algumas mudanças pontuais no quadro hematológico. A suplementação com altas dosagens (8 e 16 g/kg) promoveram melhorias em alguns parâmetros e imunidade inata, portanto, estas bactérias probióticas podem ser utilizadas como uma ferramenta para proporcionar maior resistência de pacu frente aos desafios de cultivo.

Os resultados obtidos em laboratório são promissores. No entanto, ainda se faz necessário ensaio a campo e análise econômica para validar a sua utilização na piscicultura industrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.C.; LUO, J.; RAYWARD, D.; KING, S.; GIBSON, R.; MOGHADDAM, G.H., 2008. Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. *Animal Feed Science and Technology*, 145:41–52.
- AFFONSO, S.F. 2006. Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do *peixe Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- AGARWAL, N.; KAMRA, D.N.; CHAUDHARY, L.C.; AGARWAL, L.; SAHOO, A.; PATHAK, N.N.2002. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves on different microbial feed additives. *Letters in Applied Microbiology* 34: 329–336.
- AL-DOHAIL MA, HASHIM R, ALIYU-PAIKO M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell) fingerling. *Aquaculture Research*, 40: 1642-1652.
- ALEXOPOULOS, C.; GEORGOULAKIS, I.E.A.; TZIVARA, A.; KRITAS, S. K.; SIOCHU, A.; KYRIAKIS, S.C. 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Athens, 88, 381-392.

- ALKAHEM, H.F. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of University Kuwait Science*, 21:243-252.
- ALMEIDA, L.B. et al.2008. Disbiose intestinal. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 24 (1): 58-65.
- ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. 2008. 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*, 25 : 128-136.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. 1994. Basic haematology 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, 185-202.
- ASSIS, J.M.F.; R.F. CARVALHO; L. BARBOSA; C.A. AGOSTINHO AND M.D. PAI-SILVA. 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*), *Aquaculture* 237, 251-267.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. 1999. *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wildfish*. Chichester: Springer Praxis, 3rd Edition. 459p.
- BAGUERI,T.;HEDAYATI,S.A.; YAVARI, V.; ALIZADE, M.; FARZANFAR,A.; 2008. Growth, survival and gut microbialload of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given dir supplemented with probiotics during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8: 43-48
- BAIRAGI, A., GHOSH, KS. SEN, SK. AND AK. RAY. 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal , inoculated with fish

- intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings . *Aquaculture Research*. 35: 436 - 446.
- BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D., VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114, 173-186.
- BARBOSA, T.M.; SERRA, C.R.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J.; HENRIQUES, A.O. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 968–978.
- BASHEERA JOHN, M.; CHANDRAN, M.R.; ARUNA, B.V.; ANBARASU, K. 2002. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunized with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 12:201-207.
- BILLER, J.D. 2008. Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila*, em pacu alimentado com ração suplementada com β -glucano. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 106p
- BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 853-873
- BOYD, C.E.; MASSAUT, L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture*, 20:113-132
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E. C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazônica*, 36:343-350

- BRUNT, J.; NEWAJ-FYZUL. A.;AUSTIN. B. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbau). *Journal of Fishes Diseases*, 30: 573-9.
- BRUNT. J.; AUSTIN. B.2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fishes Diseases*, 28:693-701.
- BRUUN, M. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD,I. 2003. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different *in vitro* antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, 215:11-20.
- CABELLO, F.C.2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7):1137-1144.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I. 2009. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of applied microbiology*; 106(4), 1147-1153.
- CARNEVALI, O.; DE VIVO, L.; SULPIZIO R.; GIOACCHIN, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S. 2006. Growth improvement by probiotic European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression, *Aquaculture*, 258:430-438
- CARVALHO, J.V.;LIRA, A.D.;COSTA, D.S.P.; MOREIRA, E.L.T.;PINTO, L.F.B.;ABREU, R.D.;ALBINATI, R.C.B. 2011. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, 12 (1):176-187.

- CASTRO-ESCARPULLI, G., FIGUERAS, M.J., AGUILERA-ARREOLA, G., SOLER, L., FERNÁNDEZ-REDÓN, E., APARICIO, G.O., GUARRO, J., CHACÓN, M.R. 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. Isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 41-49.
- CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; BEN SLAMA, K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 243–247.
- CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 251–256.
- COLES, E.H.1984. Função hepática. In: COLES, E.H. *Patologia Clínica Veterinária*, Manole, São Paulo, 185-219.
- COLLIER, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50: 550-552
- COLLINS, J.K.;THORNTON, G.;SULLIVAN, G.O.1998. Selection of probiotics strais for human applications. *International Dairy Journal of Amsterdam*, Amsterdam, 8:487-490.
- COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. 2004. Efeito do probiótico na resposta imune. *Ciência Rural*, Santa Maria. 34(4), 1297-1303.
- COSTA, M.M.; MEURER, F.; HAYASHI, C. et al. 2004. Microflora intestinal de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração contendo probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*). In: REUNIÃO ANUAL DA

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, Campo Grande. *Anais...*
Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia (CR-ROM).
- CREPALDI., 2007. A situação da aqüicultura e da pesca no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 30:81-85.
- CROSS, M.L.2002. Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS. Immunology and Medical. Microbiology.*, 34: 245-253.
- CYRINO, J.E.P; BICUDO A.J.A; YUJI, S.R; BORGHESI, R; DAIRIKI, J.K. 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 39:68-87 (suplemento especial).
- DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. 2006. Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. *World Aquaculture*, 37 (4): 60–62.
- DELBON, M. C.2006. Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, 91p.
- DIAS, D. C.; LEONARDO, A. F. G. ; TACHIBANA, L. ; CORRÊA, C. F. ; BORDON, I. C. A. C.; ROMAGOSA, E. ; RANZANI-PAIVA, M. J. T. 2012. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 40-45.
- DIAS, D. C. ; DE STÉFANI, MARTA VERARDINO ; FERREIRA, C. M. ; FRANÇA, F. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. ; ANTENOR, A.S AGUIAR. 2010. Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research* (Print), 41, 1064-1071.

- DIAZ-ROSALES P, ARIJO S, CHABRILLON M, ALARCON FJ, TAPIA-PANIAGUA ST, MARTINEZ-MANZANARES E, ET AL .2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293:16-21.
- DIAZ-ROSALES, P.; SALINAS, I.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, A.; CHABRILLON, M.; BALEBONA, M.C. 2006. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 482- 492.
- DIAZ-ROSALES, P.; ARIJO. S.; CHABRILLON, M.; ALARCON, F.J.; TAPIAPANIAGUA, S.T.; MARTINEZ-MANZANARES, E. 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293:16-21.
- DUC, L.H.; HONG, H.A.; BARBOSA, T.M.; HENRIQUES, A.O.; CUTTING, S.M. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4): 2161–2171.
- EL-HAROON, E.R.; GODA, AMAS.; CHOWDHURY, KMA. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37:1473–1480.
- EL-DAKAR, A.Y.; SHALABY, S.M.; SAOUD, I.P. 2007. Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13: 407-412.

- EL-RHMAN, A.M.A.; KHATTAB, Y.A.E.; SHALABY, A.M.E.2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the grown performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27: 175-180.
- FARAMARZI, M.; KIAALVANDI,S.;LASHKARBOLOOKI,M.;IRANSHAHI,F.2011. The investigations of *Lactobacillus acidophilis* as probiotics on grown performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American – Eurasian Journal of Scientific Research*, 6(1): 32-38.
- FIROUZBAKHS, F.; NOORI, F.; KHALES, M.K.; JANI-KHALILI, K. 2011. Effects of probiotic, protxin, on the grown performance and hematological parameters in the Oscar. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 833-842.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. In the Joint FAO/WHO Expert Consultation report on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 1-4
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Fishery and Aquaculture Statistics*. 2008. Rome. FAO, 2010, 21p.
- FUJIMOTO, R.; CASTRO, M.P.; MORAES, F.R.; GONÇALVES, F.D . 2005. Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), mantido em diferentes densidade de estocagem. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 31(2):155-162.
- FULLER, R. 1989. A review: probiotic in man and animals. *Journal Applied Environmental Microbiology*, 63: 1034-1039.

- GALDEANO, C.M.; PERDIGON, G. 2004. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology*.97: 673-681.
- GATESOUBE, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147 – 165.
- GENG X, DONG XH, TAN BP, YANG QH, CHI S et al. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunology*. 31: 400-406.
- GHADBAN G.S. 2002. Probiotics in broiler nutrition-a review. *Archiv für Geflügelkunde*, 66: 49-58.
- GODOY, M. P. 1975. Peixes do Brasil: subordem Characoidei: Bacia do rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Franciscana. 1-4:216
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56:35-39
- GOMES-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259-270.
- HRUBE, T. C.; SMITH, S. A. 1998. Hematology of fish. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5:1120-1125.
- HÖLMSTROM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A. et al. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. Journal of Food Science and Technology*,38:255-266.

- HONG, H.A., DUC LE, H., AND CUTTING, S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:813-835.
- HUANG, J.M.; LARAGIONE, R.M.; NUNEZ, A.; CUTTING, S.M. 2008. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53 (2):195–203.
- IBAMA. 2008. Estatística de pesca 2005-2007: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA.
- IRIANTO A, AUSTIN B. 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 26:59-62.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. 2002 .Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease* , 25: 333-342.
- JENEY, Z. AND JENEY, G. 1995. Recent achievements in studies of diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture*, 129:397-420.
- JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G.; M.C. PORTELLA. 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture*, 243:175-183.
- KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y.W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*, 44: 139-144.
- KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; JOSIE LATEGAN, M.; GIBSON, L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274 (1): 1-14.

- KIM, D.H.; AUSTIN, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 21:513-524.
- KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; O DONOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *Journal of Bacteriology*, 184:547-555.
- KLEIN, J. 1990. *Immunology*. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. 311-334.
- KUMAR R, MUKHERJEE, S. C., RANJAN, R., NAYAK, S. K. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunology*, 24: 168-172.
- LA RAGIONE, R.M. AND WOODWARD, M.J. 2003. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Veterinary Microbiology*, 94:245-256.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C. 2010. Adaptation factors of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Benef Microbes*. Review, 1(4):335-42.
- LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBASH, S.L. 1999. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, p 211.
- LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748.
- MAHONEY, J.B.; MACNULTY, J.K. 1992. Diseases- associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson- Raritan estuary. *Transactions of the American Fisheries Society*, Grosvenor Lane, 121:261-268.

- MARTINS, M.L. 2000. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) estressados. Doutorado em Aqüicultura– Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 125p.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B 2000. Falha na resposta do cortisol por captura por carragenina em *Piaratus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientarium*, Maringá, 22(2): 545-552.
- MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y. 2001. Mebendazole (*Monogenea*, Dactylogyridae) gill parasites of cultivated *Piaractus mesopotamicus*(*Osteichthyes*, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitology*, 46(4): 332-336.
- MARZOUK, M.S.; M.M MOUSTAFA.; NERMEEEN M. MOHAMED. 2008. Evaluatin of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, Cairo, Egypt, 1043-1058.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. 1996. Kinetcs of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swinbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, 33(1):5-10.
- MERRIFIELD, D.L.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M.; DIMITROGLOU, A.; DAVIES, S.J. 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition.*, 16(5): 504–510.
- MERRIFIELD, D.L.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M .; DAVIES, S.J. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II.

- Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture. Nutrition.*, 16: 496-503.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010, Produção pesqueira e aquícola - estatística 2008-2009. Disponível em www.mpa.gov.br/. Acessado em novembro/2011.
- MORIARTY, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351 – 358.
- MOUNTZOURIS, K.C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in promoting broiler performance and modulating caecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, 86: 309-317.
- MOURIÑO, J.L.P.; NASCIMENTO VIEIRA.; F, JATOBÁ, A.B.; SILVA,B.C.; JESUS, G.F.A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L.2011. Effect of dietary supplementation of inulin and *W.cibaria* on haemato-immunological parameters on hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp), *Aquaculture Nutrition*, 17:1-8.
- NAKANDAKARE, I. B. 2010. Inclusão de probióticos durante o processamento de ração para tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, variação Gift. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura e Pesca). Instituto de Pesca, São Paulo. 74p.
- NAYAK, S.K.; SWAIN, P.;MUKHERJEE,S.C. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham). *Fish Shellfish Immunology*, 23:892-896.
- NAYAK, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunology*, 29, 2-14.

- NEWAJ-FYZUL A, ADESIYUN AA, MUTANI A, RAMSUBHAG A, BRUNT J, AUSTIN B. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103:1699-1706.
- NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, AC.; BYLUND, G.; SALMINEN, S.; LILIUS, E. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunology*, 15:443-52.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. 2002. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38: 1-2.
- OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CONTE, L.; CYRINO, J.E.P. 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, 533 p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Guidelines for drinking water quality. 3.ed. 2003. Acesso em: fevereiro de 2012. Disponível em:<http://www.who.int/docstore/watersanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm>.
- OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leewenhoek*, 82: 279-289.
- PANCHENIAK, E. F. R. 2005. Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus*

reuteri LPB P01-001 em suínos. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 154p.

PASTORET, P.P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. 1998. Immunology of fishes. In: *Handbook of vertebrate immunology*, San Diego: Academic Press, 3-62.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; KOBAYASHI, T.; PUANGKAEW, J.; SATOH, S.; SUGITA, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102:379-88.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243 (1-4):241-254.

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

PÉREZ-SÁNCHEZ T, BALCÁZAR JL, GARCÍA Y, HALAIHEL N, VENDRELL D, DE BLAS I, MERRIFIELD DL. 2010. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*, 3(4):355-360.

PICCHIETTI, S.; FAUSTO, A.M. RANDELLI, E.; CARNEVALI, O.; TADDEI, A.R.; BUONOCORE, F. 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunology*, 26:368-376.

- PIETERS, N, et al. 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*. 105(3):723-732.
- PRIDMORE, R. D. et al. 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiology Letters*, Ames, 283(2), 210 – 215.
- PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. 1994. *Manual de piscicultura tropical*. Brasília: Ibama, p 196.
- QINGHUI AI.; HOUGUO XU.; KANGSEN MAI.; WEI XU.; JUN WANG.; WENBING ZHANG .2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, 317(1-4):155-161.
- RAIDA, M. K.; LARSEN, J. L.; NILSEN, M. E.; BUCHMANN, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B.licheniformis* (BIOPLUS2B). *Journal of Fish Diseases*, 26: 495 – 498.
- RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPON, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.
- RANZANI-PAIVA, M. J.T, Salles, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS.; A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. 1998/1999. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma*

- macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 25:77-83
- RANZANI- PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A. 2004. Hematologia de peixes brasileiros In: RANZANI- PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de organismos aquáticos*, Varela, São Paulo, 89-120.
- ROMBOUT J.H.W.M.; VANDERBERG, A.A.1985. Uptake and transport of ferritin in the epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell Biology International*, 9: 516.
- ROMBOUT J.H.W.M.; VANDERBERG, A.A. 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *Journal Fish Biology*, 35:13- 22.
- SAENZ DE RODRIGUEZ, M.A.; DIAZ-ROSALES, P.; CHABRILLON, M.; SMIDT, H.; ARIJO, S.; LEON- RUBIO, J.M. 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*; 15:177-185.
- SAHOO, P.K.; KUMARI,J.;MISHRA, BK. 2005. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2):151-155.
- SAKAI M, 1999.Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172 (1-2): 63-92.
- SALINAS, I.; DIAZ-ROSALES, P.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; CHABRILLON, M.; MORINIGO, M.A. 2006 .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*, 111: 279-286.

- SALINAS, I.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunology*, 19: 67-77.
- SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. 2001. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science.*, Savoy, 84:319-331.
- SAURABH, S.; SAHOO, P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39: 223-239.
- SECOMBES, C.J. 1996. The non-specific immune system: cellular defenses. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. (Ed). *The fish immune system*. London: Academic Press. 95-103.
- SENOK, A.C.; ISMAEEL, A.Y.; BOTTA, G.A. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 958-966.
- SHARIFUZZAMAN, S.M.; AUSTIN, B. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunology*, 27:440-445
- SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. 2002. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal Fish Biology*, 60: 466-478.
- SILVA, J. R. M. C.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES J. C. S.; JENSCH-JUNIOR B. E. 2005. Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, 28 (4): 326-328.
- SIWICKI, A.K.; KLEIN, P.; MORAND, M.; KICZKA W.; STUDNICKA, M. 1998. Immunostimulatory effects of dimerized lysozyme (KLP-602) on the nonspecific

- defense mechanisms and protection against furunculosis in salmonids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 61(2-4): 369–378.
- SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 273-313.
- SON, V.M. ;CHANG, C.C. ;WU, M.C. ; GUU, Y.-K. ; CHIU, C.H. ; 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coiodes*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26: 691-698.
- TACHIBANA, L.; DIAS, D. C.; ISHIKAWA, C. M.; CORREA, C. F.; LEONARDO, A. F. G.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. 2011. Probiótico na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758): desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos*, 25:25-31.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Vilimpress. 144p
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. 2004. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Homberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos do cultivo intensivo. *Acta Scientiarum*, Maringá, 26(2): 157-162.
- TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F.M.; BEYNEN, A.C. 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics - a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*. 96: 219–233.

- TUOHY, K.M.; ROUZAUD, G.C.M.; BRUCK, W.M.; GIBSON, G.R. 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 75–90.
- URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F.D. 2005. PACU (PIARACTUS MESOPOTAMICUS). IN: BALDISSEROTTO, B. & L.C. GOMES (Eds.). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Santa Maria, UFSM. 240p: 222-256.
- VASEEHARAN, B., RAMASAMY, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Applied Microbiology*, 36: 83-87.
- VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245:149-161.
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. 2000a. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64: 655–671.
- VERSCHUERE, L.; HEANG, H.; CRIEL, G. et al. 2000b. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. From the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3):1139-1146.
- VIVEKANANDHAN, G., HATHA, A.A.M., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., 2005. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 22:133–137.
- WALKER, W.A. 2008. Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infection Disease*, 46:87-91.

- WANG, Y.B.; XU, Z.R.2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*,127: 283–292
- WEDEMEYER,G, 1969. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29(3) :1247–1251.
- ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662p.
- ZHOU. X.; TIAN. Z.; WANG. Y.;LI .W.2009. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology Biochemistry*, 1742:1573-1586.
- ZMYSŁOWSKA, I., KORZEKWA, K., SZAREK, J. 2009. *Aeromonas hydrophila* in fish aquaculture. *Journal of Comparative Pathology*, 141 (4), 313.