

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Probióticos na alimentação de tilápia do
Nilo: desempenho produtivo, hematologia e
imunologia**

Marina Keiko Pieroni Iwashita

Jaboticabal - São Paulo

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Probióticos na alimentação de tilápia do
Nilo: desempenho produtivo, hematologia e
imunologia**

M.Sc., Med.Vet., Marina Keiko Pieroni Iwashita

Orientadora: Dra. Maria José T. Ranzani de Paiva

Co-Orientador: Dr. Jeffery Scott Terhune

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal - São Paulo

2012

l97p Iwashita, Marina Keiko Pieroni
Probióticos na alimentação de tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematologia, e imunologia /Marina Keiko Pieroni washita.
- - Jaboticabal, 2012
ii, 94 f.; 28cm

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, 2012.
Orientador: Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Banca examinadora: Valquiria Hyppolito Barnabe, Julio Hermann Leonhardt, Antenor Aguiar Santos, Leonardo Tachibana.

1. Imunoestimulante. 2. Imunidade inespecífica. 3. Promotor de crescimento. I. Título. II. Jaboticabal – Centro de Aquicultura da UNESP.

CDU 639.3/5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Sumário

Dedicatória	6
Oferecimento	7
Agradecimentos	8
Apoio Financeiro	11
Resumo	12
Abstract	13
1. Considerações iniciais	14
Referências	22
2. Objetivos	29
3. Capítulo 1 – Desempenho produtivo de tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> alimentada com probióticos	31
Resumo	32
Abstract	33
Introdução	34
Material e métodos	35
Resultados e discussão	37
Conclusão	39
Agradecimentos	39
Referências bibliográficas	39
Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais fornecida para tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> mantidas em aquários em sistema estático de renovação parcial de água e aeração contínua, alimentada com níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg ⁻¹ , T2 = 10g.kg ⁻¹ de probiótico na dieta) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	43
Tabela 2. Valores médios de Peso (g), Comprimento (cm), Ganho de peso (g), Consumo total (g) e Conversão alimentar (CA) de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle=0, T=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹ de probiótico na dieta) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 1. Fotomicrografia eletrônica de varredura da porção média do intestino de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dieta experimental suplementada com 10 g.kg ⁻¹ de probiótico contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> , aos 14 dias de alimentação.	45
4. Capítulo 2 – Probiótico para tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> e sua ação na hematologia, recrutamento de macrófagos policariontes e células de Langhans	46
Resumo	47
Abstract	48
Introdução	49
Material e métodos	50
Resultados e discussão	51
Conclusão	57
Agradecimentos	57
Referências bibliográficas	57
Tabela 1. Valores médios da série vermelha do sangue (RBC=Eritrócitos, Ht=hematócrito, Hb=Hemoglobina), índices hematimétricos (VCM=Volume Corpuscular Médio e CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e Proteína plasmática (Pt) de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle=0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	64
Tabela 2. Valores médios da contagem diferencial da série branca do sangue (Leu=Leucócitos, Lin=Linfócitos, Neu=Neutrófilos, Mon=Monócitos, Bas=Basófilos, Eos=Eosinófilos) de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg ⁻¹ , T2 = 10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	65
Tabela 3 - Valores médios da contagem de trombócitos (10 ³ .µL ⁻¹) de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle=0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	65
Tabela 4. Valores médios e resultado da análise de variância da contagem de células nas lamínulas após o implante em tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	66

Tabela 5. Valores médios do número de eritrócitos (RBC), porcentagem de hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb) e Proteínas totais (Pt) de juvenis de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5 g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> , e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de lamínulas de vidro em tecido subcutâneo.	67
Tabela 6. Valores médios da contagem diferencial da série branca do sangue (Leu=Leucócitos, Lin=Linfócitos, Neu=Neutrófilos, Mon=Monócitos, Bas=Basófilos, Eos=Eosinófilos) de tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle=0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> , e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de lamínulas de vidro em tecido subcutâneo.	68
Tabela 7 - Valores médios da contagem de trombócitos (10 ³ .µL ⁻¹) de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle=0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> , e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de lamínulas de vidro em tecido subcutâneo.	68
Tabela 8. Valores médios de cortisol e glicemia plasmática de juvenis de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5 g.kg ⁻¹ , T2=10 g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> , e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de lamínulas de vidro em tecido subcutâneo.	69
5. Capítulo 3 – Probiótico para tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> submetidas ao desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Streptococcus iniae</i>	70
Resumo	71
Abstract	72
Introdução	73
Material e métodos	74
Resultados e discussão	76
Conclusão	80
Agradecimentos	88
Referências bibliográficas	80
Tabela 1. Valores médios do número de eritrócitos (Er), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb) e Proteínas totais (Pt) Índices hematimétricos de juvenis de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5 g.kg ⁻¹ , T2=10 g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	85
Tabela 2. Valores médios para a produção de ânion superóxido (O ₂ ⁻) de alevinos de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5g.kg ⁻¹ ; T2=10 g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> . Leitura em DO 630nm.	85
Figura 1 – Porcentagem de hemólise de hemácias de alevinos de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , após 3 dias de alimentação com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg ⁻¹ , T2 = 10 g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	86
Figura 2 – Porcentagem de hemólise de hemácias de alevinos de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , após 7 dias de alimentação com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle =0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	87
Figura 3 – Porcentagem de hemólise de hemácias de alevinos de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , após 14 dias de alimentação com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1=5g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	88
Figura 4 – Sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentadas com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5 g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> . e inoculadas com <i>A. hydrophila</i>	89
Figura 5 – Sobrevivência de alevinos de tilápia do Nilo, <i>O. niloticus</i> , alimentadas com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle=0, T1=5 g.kg ⁻¹ , T2=10g.kg ⁻¹) contendo <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> e inoculadas com <i>S. iniae</i>	90
6. Conclusões	91
7. Considerações finais	93

Dedicatória

“Porque te amo,
Porque lhes deve a minha vida e,
Tudo aquilo que sou.
Pelos bons e maus momentos, em que nunca me deixaram só.
Pela força, pela amizade,
Pelo amor incondicional que me dedicaram desde o nascimento.
Por serem meus pilares, exemplos de força e perseverança.
Por enxugar minhas lágrimas quando não parei de chorar,
Por nunca me deixar desistir,
E me amparar em todas as quedas, às vezes, antes de cair.
Por serem os melhores pais do mundo.
Por tudo isto e muito mais, vos agradeço.
Obrigada... por serem quem são.”

À Mauro e Maria Aparecida Iwashita.

Oferecimento

“Senhor guia-me nos caminhos tortuosos da vida.

Firma meus pés e ilumina meu caminho.

Que as tuas palavras consolem o meu coração quando na
aflição e encorajem-me a continuar neste caminho
maravilhoso, mostra-me Senhor, onde e como devo agir.”

À Deus.

“Obstáculo é aquilo que você enxerga quando tira os olhos do seu objetivo.”

Justin Herald

"Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things...and curiosity keeps leading us down new paths."

Walt Disney

**Ao meu querido Ivan, meu marido,
e à Milena, minha irmã.**

Agradecimentos

À minha querida Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva, por me acolher desde o início, em seu grupo de pesquisa. Por me ensinar e perpetuar seu conhecimento, me tratar como filha quando precisei de repreensão e motivação, e como professora, quando precisei de orientação e incentivo;

Ao Prof. Dr. Jeffery Scott Terhune, por ter me recebido e orientado na Universidade de Auburn e à Theresa “Terri” Wood, do Laboratório de Fish Diseases, por todo seu auxílio, colaboração durante a execução do projeto, e por me incluir como parte de sua família, durante minha estadia na Universidade de Auburn;

Ao Prof. Dr. Julio Hermann Leonhardt, da Universidade Estadual de Londrina, por ter me apresentado à pesquisa em Aquicultura, me incentivado a seguir em frente em todos os momentos em que cogitei mudar de direção;

À Profa. Dra. Maria Cláudia N. Zerbini, pela sua orientação durante o estágio docência, junto ao curso de Hematopatologia, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP - Universidade de São Paulo. Sua delicadeza carinhosa, entusiasmo e fascínio pelo estudo da Patologia, seja ela, humana ou animal foram contagiantes;

À Profa. Dra. Elizabeth Romagosa, pelo inegável carinho e ajuda, nas coletas, redação do projeto e em todos os momentos que precisei;

Ao Prof. Dr. Antenor Aguiar Santos e Valquíria Hyppolito Barnabe, contribuírem na correção desta pesquisa com valiosos conhecimentos e enriquecer nosso trabalho;

Aos doutores Leonardo Tachibana e Danielle de Carla Dias, pela amizade, participação na execução do projeto, pela orientação no desenvolvimento dos estudos e sugestões na correção do trabalho;

À Claudinha Aparecida, pelo auxílio prestado durante as análises de Microscopia Eletrônica; e as amigas Rosiana Rodrigues Alves e Viviane Rodrigues Verdolin dos Santos pela ajuda com as análises estatísticas;

Aos estagiários e alunos do Instituto de pesca, Guilherme Silveira Telli, Thais Farias e Cynthia Ikefuti, e da Universidade de Auburn, Daniel Foree, Savannah Warren, Chase Theophilus Katechis e Chris Sayles, que nos auxiliaram durante a execução do projeto;

Aos meus amigos e família que torceram e pelos momentos de descontração essenciais nesta jornada;

A toda equipe do Departamento de Fisheries and Allied Aquacultures, da Universidade de Auburn, e aos amigos do Alabama, pelo companheirismo, descontração e carinho durante minha estada nos EUA, WAR EAGLE!!!;

Ao Instituto de Pesca e seus funcionários pela pareceria e colaboração no projeto;

Aos meus chefes e supervisores, por compreenderem minhas ausências por causa de meu grande sonho;

Ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP, por todo o auxílio prestado, especialmente à Veralice Capatto e ao David, por todo o auxílio prestado;

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa (Proc. No. 2009/11.418-0); Capes, pela bolsa de doutorado, e bolsa sanduíche (Proc. No. 1489-10-0);

À Biogen, pelo probiótico utilizado neste estudo;

Aos meus pais, Mauro Iwashita e Maria Aparecida Pieroni Iwashita, por sempre me incentivarem a estudar e não desistir nos momentos difíceis.

A minha irmã, Milena Tiemi Iwashita Salgueiro, pela sua alegria explosiva contagiante e sempre me fazer acreditar no que eu faço. Ao meu cunhado, Rodrigo Salgueiro, por amá-la.

Ao meu querido Ivan, sempre presente, em todos os momentos, sejam eles fáceis ou não, desde o início... forever ♥.

Apoio Financeiro

FAPESP, Auxílio Pesquisa, Proc. No. 2009/11418-0.

CAPES, Bolsa de Doutorado.

CAPES, Bolsa de Doutorado Sanduíche – EUA, Proc. No. 1489-10-0.

Resumo

A atividade do probiótico contendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus oryzae* foi avaliada através da inclusão de níveis do produto na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foi avaliado seu efeito no desempenho produtivo, na resposta inflamatória e na resposta imune dos peixes, através do efeito protetor contra desafios infecciosos de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus iniae*. Três dietas foram formuladas: uma sem a adição do probiótico (Controle); T1, suplementada com 5g; e T2 suplementada com 10g de probiótico por quilo de ração. As dietas continham os níveis de proteína indicados para a fase de alevinagem. Após 1, 3, 7 e 14 dias do início da alimentação coletas foram realizadas, e foi averiguado a colonização do trato gastrointestinal. Foram recuperados do trato $1,08 \times 10^6$ e $3,81 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ de *B. subtilis* e $1,0 \times 10^5$ e $1,06 \times 10^6$ de *S. cerevisiae*, dos tratamentos suplementados com 5 e 10g de probiótico respectivamente. Não foi possível recuperar o *A. oryzae*. Resultados de desempenho produtivo mostraram valores superiores em 30 dias de alimentação com 10g de probiótico por kg de ração. O hemograma e leucograma dos peixes que receberam o probiótico mostraram alterações e melhor resposta inflamatória. Estes peixes mostraram valores de cortisol e glicemia plasmática reduzidos. Os dados hematológicos dos peixes submetidos ao desafio bacteriano mostraram que o probiótico proporcionou maior resistência dos eritrocitócitos às diferenças osmóticas e à produção de ânion superóxido. Doses de 5 e 10g de probiótico por kg de ração garantiu maiores taxas de sobrevivência contra *A. hydrophila*, e doses de 10g de probiótico por kg de ração, maior sobrevivência à infecção *S. iniae*.

Palavras chaves: desempenho produtivo, hematologia, inflamação granulomatosa, probiótico, resposta imune.

Abstract

The probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae* was evaluated by including product levels in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Performance, inflammatory and immune response, and protective effect against challenge infection with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* was evaluated. Three diets were formulated: without probiotic (Control), T1, supplemented with 5g and T2, supplemented with 10g probiotic per kg of diet. The diets contained protein levels indicated for nursery phase. After 1, 3, 7 and 14 days after the beginning of feeding, samples were taken, gastrointestinal tract colonization was observed. 1.08×10^6 and 3.81×10^7 CFU.g⁻¹ of *B. subtilis* and 1.0×10^5 and 1.06×10^6 of *S. cerevisiae*, were recovered from the tract from fish fed 5 and 10g of probiotic respectively. It was unable to recover *A. oryzae*. Performance data showed higher values, in 30 days of probiotic feeding with 10g per kg of feed. The CBC and WBC of fish that received the probiotic showed better changes and inflammatory response. These fish showed levels of cortisol and reduced plasma glucose. The blood of the fish subjected to bacterial challenge showed that the probiotic provided eritrocitócitos greater resistance to the osmotic differences and the production of superoxide anion. Doses of 5 and 10g of probiotic per kg of ration ensured the highest survival rates against *A. hydrophila*, and doses of 10 g probiotic per kg of diet increased survival against *S. iniae* infection.

Key words: performance, hematology, granulomatous inflammation, probiotics, immune response.

Considerações iniciais

Considerações iniciais

A produção mundial de diversas espécies de peixes de água doce e marinha aumenta a cada ano (FAO, 2007). Os peixes criados usualmente são mantidos em espaços fechados, tais como tanques escavados, lagoas ou tanques-rede, em busca do aumento da produtividade por unidade de espaço. Esta superlotação influi na saúde dos peixes, uma vez que as condições de estocagem gera um ambiente degradado, compromete o estado fisiológico e aumenta a susceptibilidade às infecções (SAKAI, 1999).

Quando confrontados com o aparecimento de doenças, muitos produtores recorrem às drogas antimicrobianas (KESARCODI-WATSON et al., 2007). Diversos quimioterápicos são utilizados para tratar doenças infecciosas na aquicultura. No entanto, a incidência de microorganismos resistentes a drogas tem se tornado um grande problema na piscicultura (AOKI, 1992). A vacinação é um método eficaz de controle de doenças (SAKAI, 1999), porém não deve ser utilizada como meio único de prevenção (AMÁBILE-CUEVAS et al., 1995; GRAM, et al., 2001), pois promove imunidade contra um número limitado de doenças. Além disso, vacinas contra uma vasta gama de agentes patogênicos ainda não foram desenvolvidas.

Os imunoestimulantes aumentam a resistência a doenças infecciosas através da estimulação da imunidade não específica. O uso destes nutracêuticos é um meio eficaz de aumentar a imunocompetência e resistência a doenças de peixes. Pesquisas nesta área estão se desenvolvendo e muitos produtos estão em uso na indústria aquícola (SAKAI, 1999).

Os imunoestimulantes compreendem substâncias que adicionadas à dieta dos peixes beneficiam a resposta de defesa. Compreendem o grupo: vitaminas, agentes químicos, traços minerais, componentes bacterianos, polissacarídeos, fatores nutricionais, citoquinas e produtos derivados de plantas e animais (SIWICKI et al., 1990; SAKAI, 1999). Dietas com imunoestimulantes melhoram a resistência ao estresse e consequentemente às infecções de etiologias variadas devido ao incremento das respostas de defesa (VAL et al., 2006).

Dentre o grupo de imunoestimulantes encontram-se os probióticos. Estes produtos são definidos como suplementos alimentares constituídos a partir de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; GATESOUBE, 1999;

VERSCHUERE et al., 2000; IRIANTO & AUSTIN, 2002). O estado nutricional é considerado um fator importante e que determina a capacidade do peixe em resistir a doenças. Neste contexto, tem se intensificado pesquisas objetivando a nutrição e o fortalecimento da resposta imune dos peixes a fim de definir a função alimentos que influenciem na resistência a doenças (LALL, 2000).

SCHREZENMEIRE e DE VRESE (2001) definem o termo como preparações ou produtos que contém microorganismos viáveis que colonizam o sistema gastrointestinal do hospedeiro produzindo efeitos benéficos para sua saúde (ANDLID et al., 1995). Para HOROWITZ e HOROWITZ (2000), probiótico é um suplemento bacteriano adicionado a um sistema de produção para modificar ou manipular as comunidades microbianas na água, sedimento, reduzir patógenos selecionados e aumentar o crescimento e a sobrevivência de espécies cultivadas. Excreções enzimáticas, competição por nutrientes e por exclusão, são algumas das múltiplas possibilidades dos efeitos dos probióticos (GATESOUBE, 1999).

Existem hipóteses sobre o mecanismo de ação desses compostos, podendo ocorrer através de maior produção de ácido láctico (FULLER, 1977), exclusão competitiva do sítio de adesão no trato intestinal do hospedeiro (OZAWA et al., 1978), competição por locais de adesão no aparelho digestório (WATKINS e MILLER, 1983), estímulo da imunidade específica (INOOKA et al., 1986), diminuição da produção de aminas tóxicas, aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (KOZASA, 1989), economia de energia e aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (FULLER, 1989).

O estudo do uso de probióticos para organismos aquáticos tem aumentado muito, principalmente devido à necessidade de se estabelecer um manejo sustentável da aquicultura (GATESOUBE, 1999). Os probióticos utilizados na aquicultura incluem bactérias gram-positivas, negativas, bacteriófagos (SAKAI, 1999; IRIANTO & AUSTIN, 2002) e leveduras (MEURER et al., 2007).

A administração do suplemento pode ser via alimentação (FULLER, 1977, IRIANTO & AUSTIN, 2002), imersão ou aplicação (IRIANTO & AUSTIN, 2002). São produtos constituídos de bactérias como *Lactobaccillus acidophilus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*, e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (KRIZKOVÁ et al., 2001; LARA-FLORES et al., 2003; HISANO et al., 2004; PEZZATO et al., 2006; MEURER et

al., 2007; SIGNOR, 2010; ALY et al., 2008a; EL-RHMAN et al., 2009; MARENGONI et al., 2010) e *Aspergillus oryzae* (MATHIEU et al., 1996; BEHARKA e NAGARAJA, 1998; MACHIDA et al., 2005; DI FRANCIA et al., 2008).

Dentre as leveduras, a principal espécie cultivada é a *Saccharomyces cerevisiae* (KURTZMAN e FELL, 2000; SIGNOR, 2010; MEURER et al., 2007). Esta levedura tem sido utilizada para a obtenção de enzimas, glucanos, mananos e hidrolisados protéicos em processos industriais (KURTZMAN & FELL, 2000; KRISKOVÁ et al., 2001; HEIRICH et al., 2006; PEZZATO et al., 2006; VILLAREAL et al., 2006; SIGNOR, 2010).

A *S. cerevisiae* adicionada à dieta de tilápias, coloniza o seu intestino (MEURER et al., 2007). A composição da sua parede celular apresenta polissacarídeos e ácidos nucleicos de importância para nutrição animal promovendo acréscimo em seu desempenho produtivo (KRIZKOVÁ et al., 2001; LARA-FLORES et al., 2003; HISANO et al., 2004; PEZZATO et al., 2006; MEURER et al., 2007; SIGNOR, 2010; ABDEL-TAWWAB et al., 2008), promove aumento nas funções imunoestimulantes (SAKAI, 1999) na resposta imune (KRIZKOVÁ et al., 2001; VILLARREAL et al., 2006; SIGNOR, 2010) através do aumento benéfico da porcentagem de monócitos circulantes em juvenis de *O. niloticus* (CAIN et al., 2003) e maior resistência a vibrioses (SCHOLZ et al., 1999). Em desafio com *Aeromonas hydrophila* (ABDEL-TAWWAB et al. (2008) demonstraram alteração positiva nas respostas fisiológicas do organismo hospedeiro e maiores taxas de sobrevivência (KRIZKOVÁ et al., 2001; VILLARREAL et al., 2006).

Aspergillus oryzae é um fungo muito utilizado na alimentação animal por seu efeito como probiótico (MATHIEU et al., 1996, CHIQUETTE, 1995). O microrganismo é muito utilizado como suplemento alimentar para ruminantes em lactação e em engorda, por sua ação como moduladores da atividade ruminal (MATHIEU et al., 1996; YOON & STERN, 1996). O fungo promove o equilíbrio da flora e beneficia o crescimento de bactérias benéficas para o trato gastro-intestinal, através da diminuição os riscos de acidose (MATHIEU et al., 1996; YOON & STERN, 1996), por intermédio de sua função metabolizadora de nitrogênio (WARD et al., 2005).

Experimentos realizados com ruminantes, foi comprovado que o fungo tem a capacidade de estabilizar o pH e favorece a absorção de nutrientes, melhora a eficiência digestiva, além de beneficiar alguns fatores de crescimento (MATHIEU

et al., 1996, BEHARKA e NAGARAJA, 1998, DI FRANCIA et al., 2008). Além disso, seu fornecimento diminuiu os efeitos do estresse por calor (HIGGINBOTHAM et al., 1993). A adição do fungo na alimentação promoveu aumento no desempenho produtivo leiteiro em bovinos lactentes (CHIQUELLE, 1995).

A indústria alimentícia aproveita as funções fermentativas do *A. oryzae* para secretar grandes quantidades de proteínas no meio onde são cultivadas, como por exemplo as amilases, proteases, fitases e lipases (MÜLLER et al., 2002; MACHIDA et al., 2005), e traz funcionalidade aos alimentos à base de soja para a alimentação humana, além de beneficiar os ingredientes utilizados na nutrição de animais de produção (HONG et al., 2004).

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria usualmente utilizada como probiótico na aquicultura. Autores relatam aumento na absorção de nutrientes, através do incremento dos níveis de proteases em larvas (IRIANTO & AUSTIN, 2002), influi no crescimento dos peixes (IRIANTO & AUSTIN, 2002, AI et al., 2011), na taxa de sobrevivência (IRIANTO & AUSTIN, 2002; RAIDA et al., 2003; SALINAS et al., 2005; AI et al., 2011) e atua na diminuição da quantidade de bactérias patogênicas presentes no trato gastro intestinal (IRIANTO & AUSTIN, 2002; NEWAJ-FYZUL et al., 2007).

Em desafios bacterianos de infecção experimental, a quantidade de *A. hydrophila* patogênicas no trato gastrointestinal sofreu diminuição com a administração de probióticos (ALY et al., 2008c), além disso, foi verificado seu decréscimo no rim (PARK et al., 2000 in IRIANTO & AUSTIN, 2002), redução da produção de poliaminas e da atividade de enzimas digestivas (TOVAR et al., 2002 in IRIANTO & AUSTIN, 2002), e ocorreu a redução na administração de antibióticos (IRIANTO & AUSTIN, 2002). Verificou-se o aumento do apetite e melhora no desempenho produtivo de espécies cultivadas (IRIANTO & AUSTIN, 2002), uma vez que o probiótico favoreceu o desenvolvimento do sistema imune não específico, e consequentemente, aumentou a atividade dos fagócitos presentes no sangue e da lisozima (IRIANTO & AUSTIN, 2002; SALINAS et al., 2005; NEWAJ-FYZUL et al., 2007; AI et al., 2011).

A ictio-hematologia é uma ferramenta útil na avaliação do estado nutricional e da sanidade de peixes (SVOBODOVA et al., 1991; NOGA, 2000).

Dentre os efeitos da adição dos probióticos na dieta dos peixes, podemos citar sua influência nos parâmetros hematológicos dos peixes.

Resultados de estudos envolvendo hematologia de tilápias demonstraram que o número de eritrócitos circulantes foi influenciado por níveis de inclusão de probiótico na dieta contendo *S. cerevisiae* autolizada e zinco (SIGNOR, 2010). A suplementação com *B. subtilis* e *L. acidophilus* aumentou os valores de hematócrito (ALY et al., 2008a). O fornecimento de probiótico contendo *B. subtilis* e *B. licheniformis* promoveu aumento nos parâmetros hematológicos dos peixes (MEHRIM, 2009). Além disso, a suplementação dietética com *B. pumilus* agiu aumentando os valores de hematócrito e a quantidade de células brancas de defesa de tilápias (ALY et al., 2008b).

ABDEL-TAWWAB et al. (2008) observaram que a suplementação alimentar com *S. cerevisiae* influenciou na migração de células de defesa para o foco de infecção por *A. hydrophila*.

Em resposta a infecções e injúrias ao organismo, ocorre uma complexa reação protetora (SUZUKI e IIDA, 1992). As etapas do processo inflamatório incluem: alterações no sistema vascular, caracterizadas por vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos; migração de células de resposta inflamatória, remoção de debris celulares, resolução da ferida e cura (SUZUKI e IIDA, 1992).

As alterações vasculares agem no mecanismo de migração leucocitária, uma vez que, durante a vasodilatação, ocorre à rápida exsudação das proteínas plasmáticas e conseqüentemente, libera mediadores químicos, que incidem diretamente sobre a imunidade inespecífica (SUZUKI e IIDA, 1992). Este sistema imune inato tem crucial importância na resistência às doenças, pois representa a primeira barreira de proteção dos peixes (ROED et al., 1993, BALFRY et al., 1997 a,b).

Durante o processo inflamatório, os macrófagos desenvolvem-se em resposta ao estímulo inflamatório (PAPENFUSS, 2010) e desempenham papel determinante na defesa do organismo, pois a fagocitose representa importante função nos teleósteos (ADEYEMO et al., 2002).

Outros tipos de células são originadas a partir do estímulo inflamatório, como por exemplo, as células multinucleadas gigantes, os macrófagos epitelióides e os sinciciais (PAPENFUSS, 2010).

Os macrófagos se aglomeram e formam granulomas, que se fundem e formam células gigantes, que apresentam núcleos dispostos aleatoriamente no citoplasma (PAPENFUSS, 2010). Durante o estímulo inflamatório, o recrutamento de novos macrófagos provenientes da migração de células responsáveis pela fagocitose, induz à formação de células gigantes tipo corpo estranho. Estas células evoluem, durante o processo inflamatório, para células do tipo Langhans, com núcleos deslocados para a periferia, conferindo o aspecto de coroa (MARIANO e SPECTOR, 1974).

Segundo estudos realizados por MARIANO e SPECTOR (1974) estas células gigantes do tipo Langhans possuem maior atividade de fosfatase ácida e de hidrogenase succínica, atuantes na defesa celular. Estas células possuem um sistema de Golgi desenvolvido e têm melhor distribuição de organelas intracelulares o que promove vantagem na reação inflamatória celular. ENELOW et al. (1991) demonstraram que em humanos essas células gigantes possuem maior atividade oxidativa, mostram melhores respostas contra infecções por agentes patogênicos.

A maioria dos macrófagos inflamatórios surge a partir de monócitos recrutados do sangue (PAPENFUSS, 2010). Em muitas espécies de peixes, durante a inflamação, os neutrófilos migram mais rapidamente que os monócitos e macrófagos (SUZUKI e IIDA, 1992).

Em situações de inflamação aguda, os peixes estimulados experimentalmente ou de forma natural, apresentaram maior quantidade de neutrófilos e monócitos no sangue, e foi observado seu acúmulo ao redor da área afetada (ROBERTS, 1989; SUZUKI e IIDA, 1992).

No processo de fagocitose, ocorre o aumento do consumo de oxigênio molecular, conhecido como atividade respiratória ou *burst* oxidativo, onde são produzidas e liberadas espécies reativas de oxigênio (KLEIN, 1990). Produtos originados do *burst* respiratório são tóxicos para as células do mesmo modo como são para os organismos invasores, como as bactérias patogênicas (WEISS et al., 2010).

As bactérias patogênicas apresentam-se em contato direto com os peixes no meio ambiente. As doenças promovidas por elas causam grandes perdas econômicas (SHOEMACKER & KLESIOUS, 1997).

As principais doenças de origem bacteriana que afetam os peixes tanto de água doce quanto salobra são as causadas pelas espécies *S. iniae* e *A. hydrophila* (BUCHANAN et al., 2005; ALY et al., 2008a; HARIKRISHNAN et al., 2010, WU et al., 2010; AL-HARBI, 2011). Estas bactérias causam doenças septicêmicas (FIGUEIREDO et al., 2006), letargia (SHELBY et al., 2002; MCNULTY et al., 2003), natação errática, escurecimento da pele, opacidade ocular e anorexia (SHELBY et al., 2002) além de promoverem altas taxas de mortalidades, inferindo em perdas econômicas significativas em uma produção piscícola (SHOEMACKER & KLESIUS, 1997; KLESIUS et al., 2000, SALVADOR et al., 2005; RUSSO et al., 2006).

A estreptococose promove grandes mortalidades entre os peixes (BUCHANAN et al., 2005; HARIKRISHNAN et al., 2010, AL-HARBI, 2011) e é causada por bactérias em forma de cocus de respiração aeróbica (PIER & MADIN, 1976). A septicemia causada pelas bactérias do gênero *Streptococcus* sp. afetam peixes de vida livre e de cativeiro (AUSTIN e AUSTIN, 1999). Tratamento com antibióticos para infecções por *S. iniae* têm se mostrado ineficaz (KLESIUS et al., 2000), por isso outros tipos de tratamentos são buscados.

O primeiro relato da doença em peixes foi realizado em trutas arco-íris (HOSHINO et al., 1958) e após este relato, estudos identificaram espécies patogênicas: *S. disgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. parauberis* e *S. iniae* (DOMEÉNECH et al., 1996).

O *Streptococcus iniae* é uma bactéria Gram-positiva, hemolítica, capaz de causar doenças invasivas e epidemias em pisciculturas (WEINSTEIN et al., 1997; AL-HARBI, 2011). A infecção *S. iniae* em tilápias causa um decréscimo no valor do hematócrito e no número de eritrócitos (MCNULTY et al., 2003), altas taxas de mortalidade e redução do crescimento (SHOEMAKER e KLESIUS, 1997; PERERA et al., 1994). Além disso, peixes assintomáticos podem disseminar a doença na produção (SHOEMAKER et al., 2001; BUCHANAN et al., 2005). A tilápia é uma das espécies mais susceptíveis a esta bactéria (SHOEMAKER e KLESIUS, 1997; PERERA et al., 1994).

A aeromonose é outra doença que causa graves perdas econômicas na produção de peixes em cativeiro (YAMBOT, 1998; ALY et al., 2008a). É causada por bactérias do gênero *Aeromonas* sp. Desde antes de 1975, infecções

causadas por estas bactérias têm sido descritas por acometer organismos aquáticos e terrestres (SOUSSY et al., 1975).

A *A. hydrophila* é uma bactéria em formato de bacilo, Gram-negativa, móvel, oxidase e catalase positivas que fermenta açúcares (ALY et al., 2008). A doença causada pela *A. hydrophila* é caracterizada como uma enfermidade epizootica e oportunista, que acomete peixes com a saúde comprometida principalmente na época das chuvas, quando a temperatura da água diminui (YAMBOT, 1998). Os sinais clínicos mais comuns incluem septicemia hemorrágica, úlceras na pele, exoftalmia e opacidade de córnea (LARSEN e JENSEN, 1977; LU, 1992; YAMBOT, 1998; ABD-EL-RHMAN, 2009;). As bactérias podem ser isoladas de vários órgãos dos peixes (YAMBOT, 1998) e são altamente patogênicas (ALY et al., 2008).

Referências

- ABDEL-RHMAN, A.M.M. 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology, v.27, p.454-459.
- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; ISMAEL, N. E. M. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 280: 185-189.
- ADEYEMO, O.K.; AGBEDE, S.A.; MAGAJI, A.A. 2002. Clearance of colloidal carbon from the blood of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Veterinary Archives, v.72, p.109-118.
- AI., Q.; XU, H.; MAI, K.; XU, W.; WANG, J.; ZHANG, W. 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, v.317, p.155-161.
- AL-HARBI, A.H. 2011. Molecular characterization of *Streptococcus iniae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Aquaculture, v.312, p.15-18.
- ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; AZIZ, A. A. G.; MOHAMED, M. F. 2008a. 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 & Shellfish Immunology 25, 128-136.
- ALY, S.,M.; ABD-EL-RAHMAN, A.M.; GEORGE, J.; MOHAMED, M.F. 2008b. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture, v.277, p.1-6.

- ALY, S.M.; MOHAMED, M.F.; JOHN, G. 2008c. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, v.39, i.6, p.647-656.
- AMÁBILE-CUEVAS, C., GÁRDENAS-GARCÍA, M., LUDGAR, M. 1995. Antibiotic resistance. *American Science*, v.83, p.320–329.
- ANDLID, T.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; GUSTAFSSON, L. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology*, 30: 321-334.
- AOKI, T. 1992. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. In: SHARIFF, M., SUBASIGHE, R.P., ARTHUR, J.R. Eds. *Diseases in Asian Aquaculture*, v.1., Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 519–529.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 3a. Ed. Revisada. Ed. Springer-Praxis, Godalming.
- BALFRY, S.K.; HEATH, D.D.; IWAMA, G.K. 1997a. Genetic analysis of lysosyme activity and resistance to vibrosis in farmed Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, v.28, p.893-899.
- BALFRY, S.K.; SHARIFF, M.; IWAMA, G.K. 1997b. Strain differences in non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Vibro parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.30, p.77-80.
- BEHARKA, A.A. e NAGARAJA, T.G. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *Journal of Dairy Sciences*, v.81, p.1591-1598.
- BUCHANAN, J.T.; SIMPSON, A.J.; AZIZ, R.K.; LIU, G.Y.; KRISTINA, M.K.; FERAMISCO, J.; NIZET, V. 2005. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Current Biology*, v.16, p.396-400.
- CAIN, K. D.; GRABOWSKI, L.; REILLY, J.; LYTWYN, M. 2003. Immunomodulatory effects of a bacterial-derived β -1,3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a Spirulina-based diet. *Aquaculture Research*, v.34, p.1241-1244.
- CHIQUELLE, J. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. *Canadian Journal Animal Science*, v.75, p.405-415.
- DI FRANCIA, A.; MASUCCI, F.; DE ROSA, G. 2008. Effects of *Aspergillus oryzae* extract and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. *Animal Feed Science and Technology*, v.140, p.67-77.
- DOMEÉNECH, A.; DERENAÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; PASCUAL, C.; GARCIA, J.A.; CUTULI, M.T.; COLLINS, M.D.; DOMINGUEZ, L. 1996. Streptococcosis in culture turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases*, v. 19, i.1, p.33-38.
- EL-RHMAN 2009 *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.27, p.175-180.

- ENELOW, R.I.; SULLIVAN, G.W.; CARPER, H.T. 1991. Cytocin-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages. *Journal Infectious Diseases*, v.8, p.363-379.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome: FAO.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. 2006. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arquivos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(4): 678-680.
- FULLER, R. 1977 The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, Abingdon, v.18, p.85-94.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals: A review. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.
- GATESOUPÉ, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p. 147-165.
- GRAM, L.; LOVØLD, T.; NIELSEN, J.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, v.199, p.1-11.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M.S. 2010 Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.46, p.47-55.
- HEIRINCH, J.N.; KWAK, S.P.; HOWLAND, D.S.; CHEN, J.; STURNER, S.; SULLIVAN, K.; LIPINSKI, K.; CHENG, K.Y. SHE, Y.; LO, F.; GHAVANI, A. 2006. Disruption of ShcA signaling halts cell proliferation – characterization of ShcC residues that influence signaling pathways using yeast. *Cellular Signalling*, v.18, p. 795-806.
- HIGGINBOTHAM, G.E.; BATH, D.L.; BUTLER, L.J. 1993. Effect of feeding an *Aspergillus oryzae* extract on milk production and related responses in a commercial dairy herd. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.1484-1489.
- HISANO, H.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FREIRE, E.S.; GONÇALVES, G.S.; FERRARI, J.E.C. 2004. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, v.26, n.2, p.171-179.
- HONG, K.J.; LEE, C.H.; KIM, S.W. 2004. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals. *Journal of Medicinal Food*, v.7, p.430-435.
- HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. 2000. Efficacy of probiotics in growout systems. *The advocate*, v.3, p.6-12.
- HOSHINO, T.; SANO, T.; MORIMOTO, Y. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, v.44, p.57-58.
- INOOKA, S.; UEHARA, S.; KIMURA, M. 1986. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. *Poultry Science*, v.65, p.1217-1219.
- IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, v. 25, p. 633–642.

- KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. 2007. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, v.274, p.1-14.
- KLEIN, J. 1990. Immunology. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. p.311-334.
- KLESIOUS, P.H.; SHOEMACKER, C.A.; EVANS, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.188, p.237-246.
- KOZASA, M. 1989. Probiotics for animal use in Japan. *Reveu Scientifique. Technique de L'office International des Epizooties*, v.8, p.517-531.
- KRISCOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Research*, v.497, p. 213-222.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. 2000. The yeasts a taxonomic study. 4th (Ed.) revised and England edition. Elsevier. p.1055.
- LALL, S.P. 2000 Nutrition and health of fish. In: *Avances em nutrição acuícola V. Memórias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 19-22 de novembro. Mérida, Yucatán, México.
- LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMANMENDEZ, B.E. et al. 2003. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.216, n.1, p.193-201.
- LARSEN, J.L. e JENSEN, N.J. 1977. An *Aeromonas* species implicated in ulcer disease of the cod (*Gadus morhua*). *Nordisk Veterinaer Medicin*, v.29, p.199-211.
- LU, C.P. 1992. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it. *Journal of Fish*, v.16, p.282-288.
- MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M., et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, v.438, p.22-29.
- MARENGONI, N.G.; ALBUQUERQUE, D.M.; MOTA, F.L.S. 2010. Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob a inclusão de probiótico em água mesohalina. *Archivos de Zootecnia*, v.59, i.227, p.403-414.
- MARIANO M. e SPECTOR W.G. 1974. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *The Journal of Pathology*, v.113, i.1, p. 113-119.
- MATHIEU, F.; JOUANY, J.P.; SÉNAUD, J.; BOHATIER, J.B. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, v.36, p. 271-287.
- MCNULTY, S.; KLESIOUS, P.; SHOEMACKER, C. 2003. Hematological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.34, n.3, p. 418-422.
- MEHRIM, A.I. 2009. Effect of dietary supplementation of Biogen® (commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v.4, i.6, p.261-273.

- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M.M., FRECCIA, A., MAUERWERK, M.T. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia do Nilo submetidos a desafio sanitário. Revista Brasileira de Zootecnia, v.36, n.5, p. 1219-1224.
- NEWAJ-FYZUL, A.; ADESIYUN, A.A.; 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, v.103, p.1699-1706.
- NOGA, E. Fish leukocyte responses. 2000. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. Veterinary hematology, 5ª Ed., p. 436-439.
- OZAWA, K.; YABU-UCHI, K.; YAMANAK, K., 1978: Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. Microbiology. Immunity, v.23, p.1147–1156.
- PAPENFUSS, T.L. 2010. Monocytes and Dendritic Cell Production and Distribution. In: Schalm's Veterinary Hematology. 6a. Ed. Wiley Blackwell. 1206p.
- PARK S.C.; SHIMAMURA I.; FUKUNAGA M.; MORI, K. e NAKAI, T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas Plecoglossida*, as a candidate for disease control. Applied and Environmental Microbiology 66, 1416–1422, In: IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, v. 25, p. 633–642.
- PERERA, R.P.; JOHNSON, S.K.; COLLINS, M.D.; LEWIS, D.H. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica *T. aurea* hybrids. Journal of Aquatic Animal Health; v.6, p.335-340.
- PEZZATO, L.E.; MENEZES, A.; MARROS, M.M.; GUIMARÃES, I.G.; SCHICH, D. 2006. Levedura em dietas para alevinos de tilápia do Nilo. Veterinária e Zootecnia, v.13, i.1, p. 84-94.
- PIER, G.B.; MADIN, S.H. 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a Beta-Hemolytic Streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. International Journal of Systematic Bacteriology, v.26, n.4, p.545-553
- RAIDA, M.K.; LARSEN, J.L.; NIELSEN, 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, v.26, p:495-498.
- ROBERTS, R.J. 1989. The immunology of Teleost. In: Fish Pathology. London: Bailliere Tindall, p.135-150.
- ROED, K.H.; FJALESTAD, K.T.; STROMSHEIM, A. 1993. Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, v.114, p.19-31.
- RUSSO, R.; MITCHELL, H.; YANONG, R. P. E. 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture, v. 256, p. 105–110.
- RYAN G. B. e SPECTOR W. G. 1970. Macrophage turnover in inflamed connective tissues. Proceedings of the Royal Society of London (B) v.175, p. 269-292
- SAKAI, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, v.172, p.63–92.
- 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, v.19, p. 67-77.

- SALVADOR, R.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; LEONHARDT, J.H.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; DIAS, J.A. 2005. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas and earth nurseries in the northern region of Paraná State in Brazil. *Ciência Rural*, v.35, n.6, p. 1374-1378.
- SCHOLZ, U.; GARCIA DIAZ G., RICQUE D., CRUZ SUAREZ L.E., VARGAS ALBORES F.; LATCHFORD J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176, 271–283. In: IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, v. 25, p. 633–642.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinic Nutrition*, v.73, p. 361-364.
- SHELBY, R.A.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A.; EVANS, J.J. 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of Fish Diseases*, v. 25, p.1-6.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, n.2, p.174-177.
- SHOEMAKER, C., KLESIUS, P. 1997. Streptococcal disease problems and control e a review. In: Fitzsimmons K, editor. *Tilapia aquaculture*, vol. 2. Ithaca, NY: Northeast Regional Agricultural Engineering Service; 1997. p. 671 e82.
- SIGNOR, A.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G.; BARROS, M.M. 2010. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.32, p.509-519.
- SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; DIXON, O.W. 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and comparative immunology*, v.14, p. 231-237.
- SOUSSY, C.J.; SQUINAZY, F.J.; DUVAL, J. 1975. Les Aeromonas em pathologie humaine. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v.5, p.11-19.
- SUZUKI, U. e IIDA, T., 1992. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review in Fish Diseases*, v.2, p.149–160.
- SVOBODOVA, Z.; FRAVDA, D.; PALAKOVA, J. 1991. Unified methods of haematological examination of fish. *Research Institute of fish culture and hydrobiology, Vodnany, Czechoslovakia*, p. 331.
- TOVAR D.; ZAMBONINO J.; CAHU C.; GATESOUBE F.J.; VAZQUEZ-JUAREZ R. e LESEL R. 2002. Effect of yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, v.204, p.113–123. In: IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, v.25, p. 633–642.
- VAL, A. L.; MENEZES, A. C. L.; FERREIRA, M. S.; SILVA, M. DE N. P. DA; ARAUJO, R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2006. Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. In: Silva-Souza, A.T. (org.). *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. Maringá: Abrapoa, 211-228.

- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 64, p. 655–671.
- VILLARREAL, J.M.; BUENO, C.; ARENAS, F.; JABALQUINTO, A.M.; GONZÁLES-NILO, F.D.; ENCINAS, M.V.; CARDEMIL, E. 2006. Nucleotide specificity of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase kinetics, fluorescence spectroscopy, and molecular simulation studies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.38, p. 576-588.
- WARD, O.P.; QIN, W.M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. 2005. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, v.58, p.1-75.
- WATKINS, B.A. e MILLER, B.F. 1983. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, v.62, p.1772–1779.
- WEINSTEIN, M.R.; LITT, M.; KERTESZ, D.A.; WYPER, P.; ROSE, D.; COULTER, M.; MCGEER, A.; FACKLAM, R.; OSTACH, C.; WILLEY, B.M.; BORCZYK, A.; LOW, D.E. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *New England Journal of Medicine*, v.337, n.9, p.589-594.
- WEISS, D.J. 2010. Chronic inflammation and secondary myelofibrosis, Chapter 18. In: Schalm's Veterinary Hematology. 6a. Ed., Wiley-Blackwell Publication. 1206p.
- WU, C.C.; LIU, C.H.; CHANG, Y.P.; HSIEH, S.L. 2010. Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.29, p.258-263.
- YAMBOT, A.V. 1998. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from *Oreochromis niloticus* during fish disease outbreaks in the Philippines. *Asian Fisheries Science*, v.10, p.347-354.
- YOON, I.K., STERN, M.D. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *Nutrition, Feeding and Calves, Journal of Dairy Science*, v.79, p. 411-417.

Objetivos

Objetivo

Avaliar o desempenho zootécnico, os parâmetros hematológicos e a resposta inflamatória de tilápia do Nilo, alimentada com dietas suplementadas com probiótico comercial, composto pela bactéria *Bacillus subtilis*, e leveduras *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*, e submetida a desafios de infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e por *Streptococcus iniae*.

Capítulo 1

Aquaculture Nutrition

PROBIÓTICO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus*: DESEMPENHO PRODUTIVO E RECUPERAÇÃO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS PROBIÓTICAS DO INTESTINO

Resumo

Foi avaliado o efeito do probiótico constituído de três microorganismos (*Bacillus subtilis* 3×10^8 UFC, *Saccharomyces cerevisiae* 2×10^8 UFC e *Aspergillus oryzae* 4×10^6 UFC) no desempenho produtivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 270 peixes com peso médio de 25g, foram distribuídos aleatoriamente em 18 aquários de vidro (40L) contendo água desprovida de cloro e mantidas em sistema semi-estático, com aeração contínua externa. Os grupos foram divididos em três tratamentos, com seis réplicas cada: dieta controle sem probiótico, T1 com 5 g de probiótico por kg de ração e T2 com 10 g de probiótico por kg de ração. Os peixes foram alimentados por 30 dias. Biometrias foram realizadas no início da alimentação, e ao fim do período de 30 dias. Coletas do conteúdo e porções do intestino foram realizadas ao 3º, 7º e 14º dia de alimentação para avaliar a colonização e recuperação dos microorganismos probióticos do intestino. Foi possível recuperar os microorganismos do trato intestinal dos peixes que receberam a dieta com suplementação de 5 (T1) e 10g (T2) de probiótico, respectivamente $1,08 \times 10^6$ e $3,81 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ de *B. subtilis* e $1,0 \times 10^5$ e $1,06 \times 10^6$ de *S. cerevisiae*. Não foi possível recuperar o *A. oryzae*. Os peixes alimentados com a mistura probiótica apresentaram maiores valores de peso e comprimento. Os resultados mostraram que o probiótico na dose de 10g.kg⁻¹ de ração influenciou o ganho de peso e o crescimento dos peixes.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, crescimento, ganho de peso, *Saccharomyces cerevisiae*.

PRODUCTIVE PERFORMANCE OF NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* FED WITH PROBIOTICS

Abstract

The effect of a probiotic consisted of three microorganisms (*Bacillus subtilis* 3×10^8 CFU, *Saccharomyces cerevisiae* 2×10^8 UFC and *Aspergillus oryzae* 4×10^6 CFU) was evaluated on productive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 270 fish with average weight of 25g, were randomly distributed into 18 aquaria (40L) with chlorine deprived water and kept in semi-static system, with external continuous aeration. The groups were randomly divided into three treatments with six replicates each: control diet without probiotic, T1 with 5 g of probiotic per kg of diet and T2 with 10 g probiotic per kg feed. The fish were fed for 30 days. Sampling was done at the beginning of feeding, and at the end of 30 days. Samples of intestine content and portions were performed at 3, 7 and 14 days of feeding supply to assess colonization and recovery of the probiotic intestinal microorganisms. It was possible to recover from fish's intestinal tract $1,08 \times 10^6$ and $3,81 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ of *B. subtilis* and $1,0 \times 10^5$ and $1,06 \times 10^6$ of *S. cerevisiae*, respectively, of fed diet supplemented with 5 (T1) and 10 (T2) of probiotic. It was unable to recover *A. oryzae*. The fish fed the probiotic showed higher weight and length. The results showed that at the dose of the probiotic 10g.kg⁻¹ feed influence the growth and weight gain in fish.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, growth, *Saccharomyces cerevisiae*, weight gain.

Introdução

A demanda e o consumo de proteína de origem animal estão em ascensão. O crescimento da aquicultura ambiciona vencer esta procura (LARA-FLORES et al., 2003). Neste contexto, a saúde dos peixes que servirão de alimento torna-se um quesito importante.

Alguns dos promotores de crescimento e saúde mais utilizados incluem hormônios, antibióticos, ionóforos, microorganismos e sais (FULLER, 1992). Entretanto, o uso empírico e inadequado destes promotores pode resultar em efeitos adversos, bem como levar à resistência de organismos patogênicos (LARA-FLORES et al., 2003). O uso de quimioterápicos para o controle de doenças e estimular o crescimento vêm sendo condenado (RAWLING et al., 2009), portanto, buscam-se alternativas para este fim. Neste contexto, estudos que compreendem o uso de ingredientes e alimentos funcionais para promover melhora na eficiência alimentar e no desempenho dos peixes intensificaram-se nos últimos anos (SANDERS, 1998; SAKAI, 1999, NAYAK, 2010). E dentre estes suplementos estão os probióticos.

Os probióticos são definidos como aditivos alimentares compostos por um ou mais culturas de microorganismos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; SANDERS, 1998; GATESOUBE, 1999; IRIANTO & AUSTIN, 2002). Experimentos sugerem que as ingestões de microorganismos inofensivos promovem um efeito benéfico na flora intestinal (TANNOCK, 1999). Adicionados à dieta, são capazes de modificar ou manipular as comunidades microbianas, aumentar o crescimento e a sobrevivência de espécies criadas (HOROWITZ e HOROWITZ, 2000).

O *Bacillus subtilis* atua promovendo o crescimento e a viabilidade das bactérias benéficas do ácido láctico no trato intestinal de humanos e alguns animais (ALY et al., 2008). A bactéria forma esporos resistentes à passagem no interior do trato gastro-intestinal (HOA et al., 2000). Uma vez no trato, aumenta a absorção de nutrientes, incrementando os níveis de proteases, influenciando o desempenho, além de aumentar o apetite das espécies criadas (IRIANTO & AUSTIN, 2002).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura que, adicionada à dieta de tilápias, coloniza o seu intestino (MEURER et al., 2007). Além disso, contém vários compostos imunoestimulantes como os beta-glucanos, ácidos nucléicos, mananoligossacarídeos, que melhoram as respostas imunes do hospedeiro

(SIWICKI et al., 1994, ORTUÑO et al., 2002). Possui funções imunoestimulantes (SAKAI, 1999), e estimula o crescimento e a digestibilidade dos alimentos ingeridos (LARA-FLORES, et al., 2003, ABDEL-TAWWAB et al., 2008).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo utilizado na indústria alimentícia devido às suas propriedades fermentativas e capacidade de secretar proteínas (MÜLLER et al., 2002; MACHIDA et al., 2005). Experimentos realizados com mamíferos, o fungo estabilizou o pH e favoreceu a absorção de nutrientes, melhorou a eficiência digestiva, além de beneficiar alguns fatores de crescimento (MATHIEU et al., 1996, BEHARKA e NAGARAJA, 1998, DI FRANCIA et al., 2008). Além disso, diminuiu os efeitos do estresse por calor (HIGGINBOTHAM et al., 1993).

Deste modo, neste estudo avaliou a utilização do probiótico contendo *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* na alimentação de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, como suplemento dietético, observou a colonização do trato intestinal dos peixes pelos microorganismos e verificou a melhor dose administrada para obtenção dos melhores resultados no desempenho zootécnico.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca de São Paulo, Brasil. Foram utilizados 270 exemplares de tilápia do Nilo, com peso de $25\text{g} \pm 5.41$, distribuídos aleatoriamente em 18 aquários de vidro (40L), em um total de 15 peixes por unidade experimental, contendo água desprovida de cloro e mantidas em sistema semi-estático, com aeração contínua externa. O delineamento utilizado foi composto de três tratamentos: controle, T1 e T2, com seis réplicas cada.

A dieta (Tabela 1) foi confeccionada utilizando ingredientes convencionais de modo a atender às exigências nutricionais da tilápia do Nilo (NRC, 1993). O probiótico foi incorporado à dieta com óleo de soja na quantidade de 1%. Os níveis de probiótico foram: 0 (Controle), 5 g.kg^{-1} (T1) e 10 g.kg^{-1} (T2), composto por *Bacillus subtilis* ($3 \times 10^8\text{ UFC.g}^{-1}$), *Saccharomyces cerevisiae* ($2 \times 10^8\text{ UFC.g}^{-1}$) e *Aspergillus oryzae* ($4 \times 10^6\text{ UFC.g}^{-1}$).

Amostras de ração experimental foram enviadas ao Laboratório de Fungos e Microorganismos Micotoxigênicos do Departamento de Microbiologia do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para análise microbiológica e verificação da incorporação do probiótico à dieta.

Os peixes foram alimentados por um período de 30 dias. Semanalmente foram avaliados os parâmetros físicos e químicos da água: pH, amônia total e oxigênio dissolvido. A temperatura foi continuamente controlada durante o período experimental através do uso de termostato e termômetros.

Os peixes foram pesados e medidos ao início e ao final do experimento. Os parâmetros de desempenho avaliados foram: ganho de peso total (GP) = peso médio final - peso médio inicial; Peso Inicial e Final; Comprimento Inicial e Final; Consumo de ração; Conversão Alimentar: (CA) = Média de Consumo de ração/ganho de peso.

A recuperação do probiótico do trato gastro intestinal dos peixes foi realizado em seis animais de cada tratamento, selecionados aleatoriamente, insensibilizados em água gelada e gelo e mortos sem dor, por comoção cerebral. Os peixes foram descontaminados externamente através de pulverização com álcool 70%. O trato gastro intestinal foi retirado de maneira asséptica, pesados e macerados em tubos de ensaio estéreis e diluídos em 2 mL de água destilada estéril. Diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram realizadas e semeadas em placas contendo meio cultivo em duplicatas (MIRDAMADI et al., 1997; HOLDEMAN et al., 1977; HUNGATE, 1969; IRIANTO e AUSTIN, 2002; CORSO e ALMEIDA, 2009; TACHIBANA et al., 2011). As amostras foram incubadas em estufa a 30°C por 48h para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de intestino.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para averiguar a colonização do intestino pelo probiótico. A parte média do intestino de seis peixes por tratamento foi coletada de maneira asséptica e acondicionada em frascos contendo solução conservadora de glutaraldeído 3%. Em seguida, lavagens em solução tampão de cacodilato 0,1 M pH 7,2 foram realizadas. As amostras foram fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% e lavadas. Desidratação em séries crescentes de etanol foi realizada e o material seco foi metalizado com íons de ouro-paládio e observado em MEV observação da colonização.

Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada a fim de verificar diferenças entre os tratamentos. Para as diferenças, foi realizado Tukey (ZAR, 2009). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Os resultados da análise dos parâmetros físicos e químicos da água foram mantidos dentro da normalidade (BOYD, 1990; SIPAÚBA-TAVARES, 1995) durante todo o experimento e não influenciaram os tratamentos.

Alguns probióticos podem desempenhar um papel significativo na decomposição de matéria orgânica, redução nos níveis de nitrogênio e fósforo, além de controlar a quantidade de amônia, nitrito e sulfeto de hidrogênio (BOYD e MASSAUT, 1999).

Foi constatado que houve crescimento dos microorganismos pesquisados nas dietas T1 e T2, resultado que confirma a incorporação do probiótico à dieta, mantendo os níveis próximos aos adicionados à dieta. Não foi observado crescimento dos microorganismos probióticos na ração controle, demonstrando que não houve contaminação entre os tratamentos.

Em análise da colonização do intestino pelos microorganismos probióticos, no grupo controle, não ocorreu colonização, demonstrando que não houve contaminação entre as dietas.

Os peixes alimentados com T1 (5 g.kg⁻¹) e T2 (10 g.kg⁻¹), foram recuperados, respectivamente, $1,08 \times 10^6 \pm 0,8$ e $3,81 \times 10^7 \pm 1,01$ UFC.g⁻¹ de *B. subtilis* e $1,0 \times 10^5 \pm 0,5$ e $1,06 \times 10^6 \pm 0,3$ de *S. cerevisiae*. Não foi possível recuperar o *A. oryzae*. A levedura não colonizou o intestino neste ensaio, possivelmente por atuar como prebiótico, e assim, atuou melhorando o meio através da estabilização do pH e aumento da disponibilidade e captação de nutrientes (BEHARKA e NAGARAJA, 1998) para os demais microorganismos probióticos.

Os resultados mostraram que o *B. subtilis* e a *S. cerevisiae* foram capazes de colonizar o trato-intestinal das tilápias (Figura 1). Dados semelhantes foram obtidos por TACHIBANA et al. (2011) na recuperação do *B. subtilis* do trato intestinal de tilápias do Nilo. MEURER et al. (2008) verificaram a colonização do intestino pela *S. cerevisiae*, porém estes autores não realizaram a recuperação da levedura. ANDLID et al. (1995) comprovaram a capacidade das leveduras colonizarem o intestino de trutas, já SHELBY et al. (2002) demonstraram que a população bacteriana fornecida às tilápias via alimentação, permaneceram no trato gastro intestinal dos peixes por mais de 48 horas após cessado o fornecimento do probiótico.

As leveduras probióticas são encontradas no material em trânsito no intestino, porém algumas encontraram-se aderidas à mucosa intestinal (GATESOUBE, 2007). A contagem de UFC de *S. cerevisiae* no conteúdo intestinal dos peixes foram altas, pois o microorganismo permanece no ambiente por mais tempo (GATESOUBE, 2007). A recuperação dos microorganismos probióticos é importante para garantir a sua viabilidade após o consumo via alimentação e a passagem pelo trato gastrointestinal.

Os resultados da avaliação do desempenho produtivo mostram que os peixes alimentados com T2 (10g de probiótico por kg de ração) cresceram mais rapidamente e ganharam mais peso ($P < 0,05$) no intervalo de 30 dias (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por LARA-FLORES et al. (2003) na avaliação de tilápias alimentadas com probiótico contendo *S. faescium*, *L. acidophilus* e *S. cerevisiae*.

Enzimas amilolíticas e proteolíticas presentes no *A. oryzae* influenciam a digestão de nutrientes e auxiliam na digestibilidade da matéria seca (JONVEL, 1993, LEE et al., 2006). Aparentemente, o probiótico influencia a digestibilidade e explica os melhores resultados de engorda dos peixes. Animais alimentados com probióticos têm sua digestibilidade consideravelmente melhorada (BOUGON et al., 1988).

O desempenho produtivo dos peixes alimentados com 10g de probiótico por quilo de ração mostrou-se melhor que os demais tratamentos. O probiótico foi eficiente como promotor de crescimento no período avaliado. Resultados semelhantes de ganho de peso de tilápias alimentadas com probióticos são encontrados em estudos com *M. luteus* e espécies de *Pseudomonas* (EL-RHMAN et al., 2009), *S. cerevisiae* (ABDEL-TAWWAB et al., 2008, MEURER et al., 2006), *S. faescium* e *S. cerevisiae* (LARA-FLORES et al., 2003), *B. subtilis*, *B. lincheniformis* e *B. pumilus* (MARENGONI et al., 2010), *B. subtilis* e *L. acidophilus* (ALY et al., 2008).

Os peixes alimentados com o probiótico consumiram maior quantidade de ração (Tabela 2), porém não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.

Os dados de Conversão Alimentar (CA), não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Resultados semelhantes na avaliação da CA foram descritos por ALY et al. (2008) com tilápias alimentadas com *L. acidophilus*

e *B. subtilis*, por EL-RHMAN et al. (2009) que alimentou os peixes com *M. luteus* e espécies de *Pseudomonas*, por HE et al. (2009) em estudos com *S. cerevisiae* e por LARA-FLORES et al. (2003) em pesquisas com *S. faescium* e *S. cerevisiae*.

Conclusão

A suplementação da dieta para tilápias do Nilo com a mistura probiótica contendo *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* na dosagem de 10g de probiótico por quilograma de ração, influenciou o desempenho produtivo dos peixes, uma vez que os microorganismos probióticos *Bacillus subtilis* e o *Saccharomyces cerevisiae* colonizaram o trato gastro-intestinal dos peixes e o *Aspergillus oryzae* atua como pré-biótico, com o melhor desempenho dos demais microorganismos probióticos, porém não influencia a conversão alimentar dos mesmos.

Agradecimentos

A Biogen pelo probiótico. À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Proc. No. 09/14180-0) na condução do experimento. À Claudia Aparecida Rodrigues pelo auxílio no processamento das amostras de MEV e à Rosiana Rodrigues Alves e Viviane Verdolin dos Santos pela ajuda nas análises estatísticas.

Referências bibliográficas

- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; ISMAEL, N. E. M. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189.
- ALY, S. M., AHMED, Y. A., GUAREEB, A. A., et al. (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.
- ANDLID, T.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; GUSTAFSSON, L. (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology*, 30, 321-334.
- BEHARKA, A. A. e NAGARAJA, T. G. (1998). Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *Journal of Dairy Sciences*, 81, 1591-1598.

- BOUGON, M., LAUNAY, M., LE ME´ NEC, M., (1988). Influence d'un probiotique, l'Biocroissance, sur les performances des pondeuses. Bulletin d'Information Station Experimentale d'Aviculture de Ploufraga, 28, 110-115.
- BOYD, C.E., (1990). Water Quality in Ponds for Aquaculture. pp.482 Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.
- BOYD CE, MASSAUT L. (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquaculture Engineering, 20, 113-132.
- CORSO, C.R., ALMEIDA, A.C.M. (2009). Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*. Microbial Ecology, 57, 384-390.
- DI FRANCIA, A., MASUCCI, F., DE ROSA, G. (2008). Effects of *Aspergillus oryzae* extract and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. Animal Feed Science and Technology, 140, 67-77.
- EL-RHMAN, A.M.A., KHATTAB, Y.A.E., SHALABY, A.M.E. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotic for promoting the growth performance and health of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology, 27, 175-180.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66, n.5, 365–378.
- FULLER, R., (1992). History and development of probiotics. In: Fuller, R. Probiotics: the Scientific Basis, Chapman & Hall, London, 232, 1–18.
- GATESOUPÉ, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180, 147-165.
- GATESOUPÉ, F.J. (2007). Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. Aquaculture, 267, 20-30.
- HE, S., ZHOU, Z., LIU, Y. (2009). Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) cultured in cages. Aquaculture, 294, 99–107.
- HIGGINBOTHAM, G. E., D. L. BATH e L. J. BUTLER. (1993). Effect of feeding an *Aspergillus oryzae* extract on milk production and related responses in a commercial dairy herd. Journal of Dairy Science, 76, 1484-1489.
- HOA, N. T., BACCIGALUPI, L., HUXHAM, A., et al. (2000). Characterization of *Bacillus* Species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Applied and Environmental Microbiology, 66, n.12, 5241-5247.
- HOLDEMAN, L. V., CATO, E. P., MOORE, W.E.C. (1977). Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed. Virginia Polytechnic Institute. State University, Blacksburg.

- HOROWITZ, A. e HOROWITZ, S. (2000). Efficacy of probiotics in growout systems. *The advocate*, 3, n.6, 12-17.
- HUNGATE, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods of Microbiology*, 3, 117–132.
- IRIANTO A, AUSTIN B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25, 333-342.
- JONVEL, S., (1993). Use of yeast in monogastrics. *Feed Mix*, 1, n.4, 1-4.
- LARA-FLORES, M., OVERA-NOVOA, M., GUZMÁN-MENDEZ, B. E. (2003). Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193-201.
- LEE, K.W.; LEE, S.K.; LEE, B.D. (2006). *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry – a review. *International Journal of Poultry Sciences*, 5, n.1, 01-03.
- MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 22-29.
- MARENGONI, N.G., ALBUQUERQUE, D.M., MOTA, F.L.S. (2010). Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob a inclusão de probiótico em água mesohalina. *Archivos de Zootecnia*, 59, i.227, 403-414.
- MATHIEU, F.; JOUANY, J. P.; SÉNAUD, J.; BOHATIER, J. B. (1996). The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, 36, 271-287.
- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M.M. (2006). Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-Nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, n.5, 1881-1886.
- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M. M. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as probiotic for Nile tilapia fingerlings submitted to a sanitary challenge. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, n.5, 1219-1224.
- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M.M. (2008). Yeasts as probiotic for Nile tilapia during the sexual reversion phase. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9, n.4, 804-812.
- MIRDAMADI, S., MOAZAMI, N., GORGANI, M.N. (1997). Production of beta-galactosidase in submerged media by *Aspergillus oryzae* PTCC5163. *Journal of Sciences*, Islamic Republic of Iran, 8, n.1, 23-27.

- MÜLLER, C.; MCINTYRE, M.; HANSEN, K.; NIELSEN, J. (2002). Metabolic engineering of morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, n.4, 1827-1836.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. (1993). pp. 102. Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals. Washington.
- NAYAK, S.K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 2-14.
- ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 41–50.
- RAWLING, M. D., MERRIFIELD, D. L., DAVIES, S. J. (2009). Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture*, 194, 118-122.
- SAKAI, M., (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63–92.
- SANDERS, M. E. (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8, issue 5-6, 341-347.
- SHELBY, R. A.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. (2002). Passive immunization of tilapia, *O. niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of Fish Diseases*, 25, 1-6
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. (1995). pp. 72. Limnologia aplicada à aquicultura. Funep.
- SIWICK, A.K.; ANDERSON, S.P.; RUMSEY, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139.
- SIWICKI, A.K., ANDERSON, D.P., DIXON, O.W. (1990). In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and comparative immunology*, 14, 231-237.
- TACHIBANA, L., DIAS, D.C., ISHIKAWA, C.M. (2011). Probiotic in the feed of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) during sex reversal: zootechnical performance and the recovery of probiotic bacteria in the intestine. *Bioikos*, 25, i.1, 25-31.
- TANNOCK, G. W. (1999). pp. 157. Probiotics: a critical review. Horizon Scientific Press, Norfolk, United Kingdom.
- ZAR, J. H. (2009). pp. 576 Biostatistical Analysis. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.

TABELA 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais fornecida para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, mantidas em aquários em sistema estático de renovação parcial de água e aeração contínua, alimentadas com níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Ingredientes	Porcentagem (%)
Farelo de soja	48,66
Fubá de milho	1,00
Farelo de trigo	8,00
Quirera de arroz	30,50
Farinha de peixe	8,50
Óleo de soja	1,00
Fosfato bicálcico	1,60
Suplemento vitamínico e mineral	0,50
BHT	0,02
Metionina	0,12
Sal	0,10
Total	100,00
Proteína digestível (PD)	28,37
Energia digestível (kcal/kg)	3.336,00
Fibra bruta (FB)	4,08
Extrato etéreo	3,06

TABELA 2. Valores médios de Peso (g), Comprimento (cm), Ganho de peso (g), Consumo total (g) e Conversão alimentar (CA) de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Tratamentos	Peso (g)		Comprimento (cm)		Ganho de peso total (g)	Consumo total (g)	CA
	Início	Final	Início	Final			
Controle	24,94± 6,73	50,84 ^B ±8,34	11,09± 1,99	12,15 ^B ± 0,97	1178,42± 22,94	1187,31± 8,75	1,01
T1	25,06± 5,08	51,18 ^B ±4,51	10,85± 1,75	11,31 ^B ± 0,62	1144,54± 23,78	1232,21± 8,42	1,08
T2	25,46± 6,79	55,94 ^A ±6,99	11,26± 0,92	12,34 ^A ± 0,89	1353,93± 56,16	1256,19± 13,98	0,93

*Médias nas colunas seguidas por letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

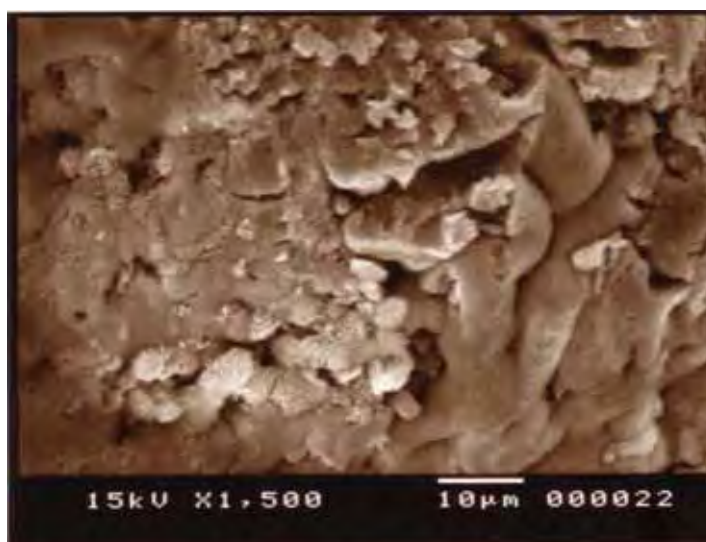


Figura 1. Fotomicrografia eletrônica de varredura da porção média do intestino de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental suplementada com 10 g.kg⁻¹ de probiótico contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, aos 14 dias de alimentação.

Capítulo 2

Veterinary Pathology

PROBIÓTICO PARA TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus* E SUA AÇÃO NA HEMATOLOGIA, RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS POLICARIONTES E CÉLULAS DE LANGHANS

Resumo

A atividade probiótica de três microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*) foi avaliada por seus efeitos nos parâmetros hematológicos e sua influência na resposta inflamatória crônica, através do recrutamento de células policariontes e formação de células de Langhans em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 270 peixes foram distribuídos aleatoriamente em 18 aquários de vidro, perfazendo 15 peixes por aquário. Foram designados três tratamentos, com seis repetições cada: 0 (Controle), 5g (T1) e 10g (T2) de probiótico por quilo de ração. Os peixes foram alimentados por 30 dias. Coletas de sangue foram 3, 7 e 14 dias após o início da alimentação. Foram avaliados o hemograma, leucograma e contagem de trombócitos. Lamínulas de vidro foram inseridas no tecido subcutâneo dos peixes no 30º dia de alimentação e retiradas após três, sete e 14 dias. Foram avaliadas quantitativamente quanto às células da resposta inflamatória. Coletas de sangue foram realizadas em 30 peixes de cada tratamento, nos mesmos dias designados. Dosagens de proteínas totais, glicose e cortisol foram realizadas com o plasma. O hemograma não apresentou diferenças estatísticas. No leucograma, linfocitose foi observada em T1 e T2. Monocitose, eosinofilia e trombocitose foram observadas no grupo controle. Os dados de resposta inflamatória mostraram migração de macrófagos e adesão nas lamínulas a partir do 3º dia, em maior quantidade nos grupos T1 e T2, porém sem formação de células de Langhans, que foram observadas a partir do 7º dia. Neste ensaio, os peixes de T1 e T2 mostraram diferenças em RBC e Ht. No leucograma, neutrofilia, leucocitose e trombocitose foram verificadas em T2. Intensa eosinofilia foi observada no 14º dia no grupo controle. Níveis elevados de cortisol e glicose plasmática foram observados nos peixes do grupo controle no 3º e 7º dia. Os resultados mostram que a suplementação com o probiótico influenciou na resposta inflamatória dos peixes.

Palavras chave: hematologia, resposta inflamatória, migração de macrófagos, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*

PROBIOTICS FOR NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* AND ITS EFFECTS ON HEMATOLOGY AND POLYCARIONT MACROPHAGE RECRUITMENT AND LANGHANS CELLS

Abstract

The activity of three probiotic microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*) were evaluated for their effects on hematological parameters and on chronic inflammatory response by recruiting of polycariont cells and formation of Langhans cells in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 270 fish were randomly distributed into 18 glass aquaria, totaling 15 fish per tank. Were assigned three treatments with six replicates each: 0 (control), 5g (T1) and 10 (T2) of probiotic per kg of diet. The fish were fed for 30 days. Blood samples were 3, 7 and 14 days after initiation of feeding. We evaluated the blood count, WBC and thrombocyte count. Glass slides were inserted into fishes' subcutaneous tissue on the 30th feeding day and removed after three, seven and 14 days. Inflammatory response cells were quantitatively evaluated. Blood samples were taken from 30 fish per treatment, in the designated days. Total protein, glucose and cortisol was carried out with the plasma. The blood test showed no statistical differences. Lymphocytosis was observed in T1 and T2. Monocytosis, eosinophilia and thrombocytosis were observed in the control group. The data showed inflammatory macrophage migration and adhesion on glass slides in the 3rd day, in higher quantity in groups T1 and T2, but without formation of Langhans cells, which were observed from day 7. In this test, the fish fed T1 and T2 showed differences in RBC and Ht. In the WBC, neutrophils, leukocytosis and thrombocytosis were observed in T2. Intense eosinophilia was observed on day 14 in the control group. Elevated levels of cortisol and plasma glucose were observed in fish from the control group 3 and 7 days. The results show that the probiotic supplementation influences the inflammatory response of the fish.

Keywords: hematology, inflammatory response, macrophage migration, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*

Introdução

Os alimentos ingeridos têm uma relação clara com a saúde dos animais. Além de fornecer os nutrientes e calorias necessárias para a manutenção da saúde, eles podem contribuir para a prevenção de uma gama de doenças (SANDERS, 1998, OLIVEIRA et al., 2002). Os estudos no desenvolvimento de alimentos funcionais e ingredientes que promovam o aumento da eficiência alimentar e melhora no desempenho dos peixes intensificaram-se nos últimos anos (SANDERS, 1998). Dentre os alimentos funcionais, estão os probióticos.

Os probióticos são definidos como aditivos alimentares compostos de um ou mais microorganismos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; SANDERS, 1998; GATESOUBE, 1999; IRIANTO & AUSTIN, 2002).

Pesquisas sugerem que a ingestão de microorganismos probióticos promove efeito benéfico na flora intestinal (TANNOCK, 1999; IRIANTO e AUSTIN, 2002; LARA-FLORES et al., 2003). Adicionados à dieta, os probióticos são capazes de modificar ou manipular as comunidades microbianas, além de reduzir patógenos selecionados por exclusão competitiva (TOURNOT, 1989; HOA et al., 2000; NAYAK, 2010), e aumentar o crescimento e a sobrevivência dos peixes (HOROWITZ e HOROWITZ, 2000). A suplementação alimentar com probióticos influencia positivamente o estado de saúde de tilápias do Nilo, incrementando os parâmetros imunológicos e melhorando os parâmetros hematológicos (ALY et al., 2008).

A avaliação dos parâmetros hematológicos dos peixes determina a capacidade fisiológica e energética dos animais em responder à uma demanda adversa. A alimentação com probióticos promove aumento no número de eritrócitos (RBC), no volume corpuscular médio (VCM), na taxa de hemoglobina intracelular (Hb) e na quantidade de leucócitos em bagres africanos (AL-DOHAIL, 2009). Em tilápias, a suplementação com probióticos influencia no valor do hematócrito (Ht) (ALY et al., 2008a), monócitos e linfócitos (ALY et al., 2008c).

Os probióticos interagem com as células fagocíticas de defesa, como os macrófagos, monócitos, leucócitos polimorfonucleares e neutrófilos, a fim de melhorar a imunidade inata (NAYAK, 2010). Peixes alimentados com probiótico mostraram aumento na atividade fagocítica, através do incremento da fagocitose e quimiotaxia (SAKAI, 1999). Assim, o uso de probióticos é uma alternativa promissora para o controle de doenças em peixes (LUNDÉN et al., 2002).

O *B. subtilis* é um microorganismo probiótico que atua promovendo o crescimento e a viabilidade das bactérias benéficas no trato intestinal de humanos e animais (ALY et al., 2008). Sua capacidade de produzir esporos garante sua sobrevivência à passagem no trato gastro-intestinal do hospedeiro (HOA et al., 2000).

A *S. cerevisiae* é uma levedura que contém propriedades imunoestimulantes (beta-glucanos, ácidos nucleicos e mananoligossacarídeos) que melhoram as respostas imunes (SIWICKI et al., 1994, SAKAI, 1999, ORTUÑO et al., 2002), a digestibilidade dos alimentos e promove o crescimento dos peixes (LARA-FLORES, et al., 2003, ABDEL-TAWWAB et al., 2008).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo utilizado na indústria alimentícia pela sua propriedade fermentativa e de secreção de proteínas (MÜLLER et al., 2002; MACHIDA et al., 2005). Em experimentos realizados com mamíferos, foi comprovado que o fungo tem a capacidade de estabilizar o pH gástrico e favorecer a absorção de nutrientes no trato gastro-intestinal, melhorar a eficiência digestiva, além de beneficiar alguns fatores de crescimento (BEHARKA e NAGARAJA, 1998, DI FRANCIA et al, 2008). Além disso, a levedura diminui os efeitos do estresse por calor (HIGGINBOTHAM et al., 1993).

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a influência da suplementação com probióticos contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre os parâmetros hematológicos e na resposta inflamatória, através do recrutamento de macrófagos policariontes em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca de São Paulo, Brasil. Foram utilizados 270 exemplares de tilápia do Nilo, com peso médio de 25g, distribuídos aleatoriamente em grupos de 15 peixes em 18 aquários de vidro (40L), contendo água desprovida de cloro e mantido em sistema semi-estático, com aeração contínua externa.

Os peixes foram divididos em três tratamentos, com seis réplicas cada e alimentados com dieta basal suplementada com níveis de probiótico composto de *Bacillus subtilis* (3×10^8 UFC.g⁻¹), *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^8 UFC.g⁻¹) e

Aspergillus oryzae (4×10^6 UFC.g⁻¹): 0 (controle), 5 g (T1) e 10 (T2) g de probióticos por quilograma de ração. Os peixes foram alimentados por um período de 30 dias.

Colheitas de sangue foram realizadas em 30 peixes de cada tratamento, nos dias um, três, sete e 14. Foram avaliados: número total de células (RBC), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e realizadas a contagem diferencial e total dos leucócitos e contagem de trombócitos. Com o plasma, foi mensurada a quantidade de proteína plasmática total (Pt) (FELDMAN et al., 2000).

Lamínulas de vidro (9 mm de diâmetro) foram implantadas no tecido subcutâneo, na região latero-dorsal esquerda de 30 peixes por tratamento, escolhidos aleatoriamente, segundo modelo adaptado de GONÇALVES (2009). O procedimento foi realizado após 30 dias de alimentação.

Os animais foram anestesiados com solução aquosa de benzocaína (1:20.000), e mantidos em plano anestésico até a perda do equilíbrio e redução dos movimentos operculares para realização do procedimento cirúrgico (WEDEMEYER, 1997; MATUSHIMA e MARIANO, 1996). Após três, sete e 14 dias, as lamínulas foram retiradas em novo procedimento cirúrgico, lavadas em solução salina 0,65% e em seguida, fixadas em solução de Bouin por cinco minutos. Foram coradas com Rosenfeld e examinadas em microscópio de luz em aumento de 100 vezes (GONÇALVES, 2009) para avaliação quantitativa de macrófagos aderidos. Avaliou-se quanto ao número de macrófagos, quantidade de núcleos e células do tipo Langhans.

Colheitas de sangue foram realizadas para observar possíveis alterações no hemograma dos peixes submetidos à inflamação crônica induzida. Com o sangue restante, foi obtido o plasma, que depois foi utilizado para a análises de cortisol (ELISA), glicemia e proteína plasmática total (Pt) (FELDMAN et al., 2000).

Diferenças entre os tratamentos foram verificadas realizando-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey (ZAR, 2009). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Na avaliação do hemograma dos peixes alimentados com a suplementação probiótica mostraram que não ocorreram diferenças significativas nos resultados

nesta etapa do experimento (Tabela 1). Entretanto, os valores de Ht e Hb foram maiores ($P < 0,05$) nos grupos T1 e T2 em todos os dias do ensaio.

O aumento nos valores de Ht e Hb, mesmo que pequeno, indicam que o probiótico é seguro para os peixes (BLAXHALL, 1972; ALY et al., 2008).

Os resultados do leucograma não mostraram diferenças estatísticas ($P = 0,33$) entre os peixes dos tratamentos (Tabela 2). Neutrofilia e basofilia foram observadas no grupo controle no 1º dia.

Peixes expostos a estímulos estressantes, como o confinamento experimental, demonstram aumento no número de neutrófilos circulantes (SILVEIRA e RIGORES, 1989). Os valores de basófilos encontrados estão de acordo com outros estudos realizados, e são raramente encontrados na espécie (UEDA et al., 1997). Eosinofilia foi observada no mesmo grupo ao 7º dia e monocitose no 14º dia (Tabela 2). Estes resultados remetem, possivelmente, a um estímulo estressor crônico em decorrência da resposta ao estresse de experimento e/ou má assimilação do aporte de nutrientes, situação que não é vista nos animais que receberam a suplementação probiótica.

A má assimilação de nutrientes pode vir a gerar colite (ASTER, 2010). A supressão desta alteração nos grupos alimentados com o probiótico indica a influência na manutenção da saúde do trato gastro-intestinal (ASTER, 2010).

Linfocitose foi observada no 3º dia nos peixes de T1 e T2 (Tabela 2). Este aumento sugere o probiótico influenciou no aumento dos valores de linfócitos, uma vez que, o fornecimento de imunoestimulantes promove linfocitose nos peixes (SAKAI, 1999). Além disso, o aumento dos valores dos leucócitos como, por exemplo, linfócitos, mesmo que sutil, reflete a intensificação do mecanismo de defesa celular (SOPINSKA, 1985).

Eosinófilos foram encontrados com maior frequência no 14º dia nos grupos controle e T2 (Tabela 2). Este aumento em sua quantidade pode estar relacionado a um leve estímulo estressor, no caso do grupo controle ou com a presença do probiótico na água de cultivo dos peixes de T2. Estas células podem atuar junto ao sistema de defesa do organismo através do processo de fagocitose e função microbiocida (MESEGUER et al., 1994).

Trombocitopenia também foi observada no grupo controle (Tabela 3). Aumento no número de trombócitos é de grande valia para os peixes, uma vez

que este tipo celular possui, dentro de suas ações, funções de defesa (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). As células da série branca desempenham papel importante no sistema imune inato dos peixes e a sua avaliação é considerada um indicador do seu estado de saúde (SECOMBES, 1990).

A avaliação da migração de macrófagos e formação de células gigantes foi possível a partir do 3º dia (Tabela 4) em todos os tratamentos. Foi observada a presença de macrófagos aderidos em toda a superfície da lamínula e células com mais de 1 núcleo. Com a evolução do processo inflamatório em função do tempo, a quantidade de células aderidas nas lamínulas e a quantidade de núcleos foram crescentes.

No 3º dia, os grupos alimentados com T1 e T2 mostraram maior quantidade de macrófagos com um único núcleo ($P<0,05$). Células com 11 a 20 núcleos e células de Langhans não foram observadas em nenhum grupo (Tabela 4).

A partir do 7º dia, células com 11 a 20 núcleos foram encontradas em T1 e T2 (Tabela 4). Além disso, diferenças significativas entre os tratamentos foram encontradas em todos os grupos, exceto na contagem de células com 2 a 5 núcleos.

Os peixes alimentados com o probiótico mostraram maior quantidade de macrófagos no 14º dia ($P<0,05$), entretanto, diferenças foram observadas somente na quantificação de células com 1 núcleo e do tipo Langhans (Tabela 4).

A aderência de células gigantes a partir do 7º dia de observação neste experimento corrobora aos resultados obtidos por JENSCH-JUNIOR et al. (2006) em estudos de inflamação com curimatá. Neste experimento de avaliação da resposta inflamatória, a quantidade de células de Langhans aumentou conforme o tempo. Aos 14 dias de ensaio, os peixes alimentados com T2 apresentaram maiores quantidades de células que os demais grupos (Tabela 4). O recrutamento de macrófagos, a formação de gigantócitos e seu processo de maturação, para a formação de células de Langhans, refletem o bom desempenho da reação inflamatória em resposta à adição do probiótico na alimentação dos peixes.

A fagocitose promovida pelos macrófagos tem sido utilizada como parâmetro imunológico para avaliar a saúde e resposta imune de peixes submetidos a diferentes fatores bióticos e abióticos, como as dietas experimentais (BLAZER, 1991). A administração de probióticos desencadeia a ativação das células fagocíticas e aumentam a sua atividade de eliminar agentes patogênicos e debris celulares (RUTHERFURD-MARKWICK e GILL,

2004). Após duas semanas de alimentação com probióticos, foi observado aumento significativo na atividade fagocítica em tilápias (PIRARAT et al., 2006). Através desse aumento, a reação proliferativa de macrófagos é gerada em resposta a um estímulo de remoção de debris necróticos ou agentes infectantes (WEISS, 2010). Com isso, a capacidade dos macrófagos em aderir a superfícies de vidro representa um bom modelo para o estudo da inflamação em peixes (GOODWIN e GRIZZLE, 1991, SUZUKI e IIDA, 1992).

Em camundongos, as células gigantes mostraram melhor desempenho na fagocitose de bactérias patogênicas, inferindo que existe uma vantagem na presença deste tipo de célula frente a uma resposta inflamatória (MARIANO e SPECTOR, 1974). Em humanos, estas células mostram-se melhor preparadas para agir contra patógenos por apresentar maior atividade oxidativa (ENELOW et al., 1991). A presença de células gigantes em peixes teleósteos sugere que a sua formação pode ser considerada um mecanismo não específico de defesa celular (JENSCH-JUNIOR et al., 2006).

A avaliação dos parâmetros hematológicos do processo de inflamação crônica mostrou que a contagem de RBC dos peixes que receberam T1 e T2 apresentaram maiores valores quantitativos ao longo do experimento (Tabela 5). Entretanto, diferenças significativas foram observadas unicamente no 3º dia, onde o grupo controle mostrou maior valor de RBC. Os resultados mostrados neste dia foram considerados fato isolado, uma vez que os peixes do grupo não apresentaram outros sinais clínicos que indicassem alterações fisiológicas.

A administração de probióticos pode aumentar o número de eritrócitos, granulócitos, macrófagos e linfócitos em espécies de peixes (IRIANTO e AUSTIN, 2002; KUMAR et al., 2008). EL-RHMAN et al. (2009) encontraram valores de eritrócitos maiores em tilápias do grupo controle em experimento com probióticos contendo espécies de *Pseudomonas*.

Maiores taxas de Ht foram observadas nos grupos alimentados com o probiótico (Tabela 5). A suplementação com a mistura probiótica agiu na elevação do Ht neste experimento. A partir do 3º dia de alimentação, os valores de Ht foram maiores ($P < 0,05$) nos grupos alimentados com T2.

Resultados semelhantes foram descritos por ALY et al. (2008) em tilápias alimentadas *B. subtilis* e *L. acidophilus*, e por ABDEL-TAWWAB et al. (2008), que as alimentou com *S. cerevisiae*.

O aumento nos valores de hematócrito após um mês de alimentação mostra a seguridade do probiótico utilizado e sua eficácia em melhorar o estado de saúde, enquanto que valores reduzidos de Ht indicam que os peixes não estão comendo ou estão sofrendo com infecções (SCHIFFRIN et al., 1997).

A quantidade de proteínas totais nos peixes submetidos ao desafio inflamatório foi maior nos peixes alimentados com o probiótico (Tabela 5). O grupo controle apresentou maior quantidade de proteínas no soro somente no 3º dia. Esta alteração não mostrou trazer benefícios aos peixes do grupo e não promoveu alterações clínicas.

A quantidade de proteínas totais é um reflexo da imunidade inata (WIEGERTJES et al., 1996). A suplementação probiótica é relacionada ao aumento na quantidade de proteínas, que influencia a primeira barreira de defesa contra patógenos (MAGNADÓTTIR, 2006; ABDEL-TAWWAB et al., 2008). Além disso, bom estado nutricional, a funcionalidade dos órgãos vasculares e as funções hepáticas estão relacionados com maiores níveis de proteínas em tilápias alimentadas com probióticos (ABDEL-TAWWAB et al., 2008).

SHARIFUZZAMAN e AUSTIN (2009) observaram que trutas alimentadas com o probiótico *Kocuria* SM1, apresentaram valores maiores de proteínas totais em seu soro durante a 2ª semana de alimentação. NEWAJ-FYZUL et al. (2007) em estudos com *B. subtilis*, verificaram maiores valores de proteínas totais no soro em peixes que receberam o probiótico.

Neste ensaio de inflamação, os índices hematimétricos, VCM e CHCM, não mostraram alterações (Tabela 5). Os valores não diferiram entre os tratamentos durante o experimento ($P < 0,05$). Estes resultados revelam que o probiótico utilizado não promove alteração no tamanho das hemácias ou na quantidade de Hb nos eritrócitos (Tabela 6). Os dados deste ensaio confirmam os resultados encontrados por MEHRIM (2009) que não observou alterações em VCM e CHCM em peixes alimentados com probiótico comercial.

Neutrofilia foi observada no grupo controle no primeiro dia de colheita ($P < 0,05$), e causou um aumento na quantidade de leucócitos no grupo (Tabela 6).

Linfocitose foi observada no 3º dia nos grupos que receberam o probiótico. Após esta observação, os valores retornaram a normalidade para a espécie. Este aumento de quantidades de células seguido de seu decréscimo foi atribuído ao estresse do experimento.

Resultados semelhantes foram observados em tilápias alimentadas com fitobiótico (RAWLING et al., 2009) por 10 semanas. Em experimentos com trutas, *O mykiss* e *Salvelinus fontinalis*, submetidas ao estresse de confinamento e manipulação, ocorreu leve aumento seguido de diminuição no número de células brancas do sangue (BENFEY e BIRON, 2000). A suplementação probiótica com *L. plantarum* induziu a maior produção e/ou liberação de leucócitos totais e linfócitos circulantes em tilápias (JATOBÁ et al., 2008), influenciando a resposta imune inespecífica, uma vez que o probiótico em contato com o epitélio intestinal induz a ativação e multiplicação das células responsáveis pela defesa (GILL, 2003).

Eosinofilia foi observada no grupo controle que recebeu o implante de lamínula, no 14º dia de ensaio de resposta inflamatória (Tabela 6). Este aumento está possivelmente relacionado ao implante do corpo estranho, que induziu a resposta inflamatória no peixe. Por causa disso, infere-se que o probiótico atenuou os efeitos da reação inflamatória nas tilápias.

Os eosinófilos suprimem imediatamente as reações de hipersensibilidade, e têm a capacidade de fagocitar partículas inertes apesar de ser menos eficientes que os neutrófilos e outras células fagocíticas e possuírem níveis mais altos de peroxidase (YOUNG e MEADOWS, 2010).

No 14º dia, trombocitose foi observada nos grupos alimentados com o probiótico (Tabela 7) ($P < 0,05$). Este aumento na quantidade de trombócitos associa-se ao efeito de incremento na resposta do sistema imune, uma vez que este tipo de células é responsável pela defesa do organismo (MATUSHIMA e MARIANO, 1996).

Tilápias submetidas ao estresse de exposição tóxica, mostraram a mesma alteração após 2 semanas (ISHIKAWA et al., 2007).

Maiores valores de cortisol circulante foram observados no grupo controle no 3º dia e no grupo T2 ao 14º dia de ensaio de resposta inflamatória induzida pelo implante de lamínula de vidro no subcutâneo (Tabela 8).

Em geral, os dados de cortisol plasmático são valiosos, uma vez que o hormônio está envolvido nos ajustes metabólicos, e age sobre a mobilização de carboidratos, no metabolismo proteico e lipídico (PICKERING, 1993, WENDELAAR BONGA, 1997). O cortisol é conhecido por aumentar glicose no sangue e junto com os hormônios ligados ao estresse, como as catecolaminas, cortisol pode ser influenciado por fatores internos como o estresse nutritivo (REID et al. 1998).

Porém, aumentos na glicose sanguínea podem ser observados mesmo quando a secreção do cortisol está comprometida (COSTAS et al., 2008).

No 7º dia, o valor do cortisol no grupo T2 mostrou-se elevado e a glicose estava estável (Tabela 8). Já foi demonstrado em estudos anteriores que as catecolaminas podem agir nos níveis de glicose (WAGNER et al., 2003) devido diferentes mecanismos que podem ser atribuídos ao modo de ação do cortisol (VIJAYAN et al. 1991, VIJAYAN e MOOM, 1994, TRENZADO et al. 2003).

No 14º dia, as taxas de cortisol e glicemia não apresentavam diferenças ($P < 0,05$), possivelmente à adaptação dos animais às condições experimentais.

Os valores de glicemia plasmática mostraram que os animais que receberam a mistura probiótica apresentaram menores valores de glicose plasmática. O aumento do valor de cortisol e glicose no sangue são indicadores muito utilizados para expressar condições de estresse (MORGAN e IWANA, 1997, IWANA, 1997, WENDELAAR BONGA, 1997, WELLS e PANKHURST, 1999). Com isso, é possível afirmar que o probiótico suprimiu os efeitos do estresse.

Conclusões

Com base nos dados analisados, conclui-se que a mistura probiótica influencia os parâmetros hematológicos dos peixes submetidos à inflamação induzida pelo implante da lamínula em tecido subcutâneo de tilápia do Nilo. Os resultados indicam que a suplementação dietética com a mistura probiótica contendo *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*, favoreceu a melhora na saúde dos peixes, incrementando sua resistência e resposta inflamatória.

Agradecimentos

À Biogen, pelo probiótico. À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Proc. No. 09/14180-0) na condução do experimento. À Viviane Verdolin dos Santos, pela ajuda nas análises estatísticas.

Referências bibliográficas

ABDEL-TAWWAB M; ABDEL-RAHMAN AM; ISMAEL NEM. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia,

- Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189, 2008.
- AL-DOHAIL MA, HASHIM R, ALIYU-PAIKO M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus* , Burchell) fingerling. *Aquac. Res.*, 40:1642 -1652, 2009..
- ALY SM, AHMED YA, GUAREEB AA. 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 Shellfish Immunol.*, 25: 128-136, 2008.
- ASTER J.C. Red Blood Cell and Bleeding Disorders. *In: Robins Pathologic Basis of Disease*. 7a. Ed. 1525p. Elsevier Saunders. 2010.
- BEHARKA AA. e NAGARAJA TG. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.*, 81: 1591-1598, 1998.
- BENFEY TJ e BIRON M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176, 2000.
- BLAXHALL PC. The haematological assessment of the health of freshwater fish. *J. Fish Biol.*, 4: 593-604, 1972.
- BLAZER VS. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 77 – 86, 1991
- COSTAS B, ARAGÃO C, MANCERA JM, DINIS MT e CONCEIÇÃO LEC. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquac. Res.*, 39: 1-9, 2008.
- DI FRANCIA A, MASUCCI F, DE ROSA G. Effects of *Aspergillus oryzae* extract and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 140: 67-77, 2008.
- EL-RHMAN AMA, KHATTAB YAE, SHALABY AME. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotic for promoting the growth performance and health of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 27: 175-180, 2009
- ENELOW JI, SULLIVAN GW, CARPER HT. Cytokine-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages. *J. Infect. Dis*, 8: 363-379, 1991.
- FELDMAN BF, ZINKL JG e JAIN NC. Schalm's Veterinary Hematology, 5a.Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2000.
- FULLER R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: (5).365–378, 1989.

- GATESOUBE FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180:147-165, 1999.
- GILL HS. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. *Res. Clin. Gastroenterol.*, 17: 755 -773, 2003.
- GONÇALVES A. Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina. Tese. Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal. 65 f. 2009.
- GOODWIN AE, GRIZZLE JM. Granulomatous inflammation and monstrous giant cells in response to intraperitoneal hormone implants in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Comp. Pathol.*, 104:148–160, 1991.
- HIGGINBOTHAM GE, BATH DL e BUTLER LJ. Effect of feeding an *Aspergillus oryzae* extract on milk production and related responses in a commercial dairy herd. *J. Dairy Sci.*, 76: 1484-1489, 1993.
- HOA NT, BACCIGALUPI L, HUXHAM A. Characterization of *Bacillus* Species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microb.*, 66 (12): 5241-5247, 2000
- HOROWITZ A e HOROWITZ S. Efficacy of probiotics in grows out systems. *The Adv.*, 3: 6-12, 2000.
- IRIANTO A, AUSTIN B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 25: 333-342, 2002.
- ISHIKAWA NM, RANZANI-PAIVA MJT, LOMBARDI JV, FERREIRA CM. Hematological parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Braz. Arch. Bio. Tech.*, 50 (4): 619-626, 2007.
- IWANA GK..Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Science*, 851: 304-310, 1997.
- JATOBÁ A, VIEIRA FN, NETO CB. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43 (9):1201-1207, 2008.
- JENSCH-JUNIOR BE, PRESSINOTTI LN, BORGES JCS. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Aquaculture*, 251: 509-515, 2006.
- KUMAR R, MUKHERJEE SC, RANJAN R, NAYAK AK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 24:168-172, 2008.

- LARA-FLORES M, OLVERA-NOVOA MA, GUZMAN-MÉNDEZ BE. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 193–201, 2003.
- LUNDÉN T, LILIUS E, BYLUND G. Respiratory burst activity of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture*, 207: 203-212, 2002.
- MACHIDA M, ASAI K, SANO M. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438: 22-29, 2005.
- MAGNAÓTTIR B. Innate immunity of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20:137–151, 2006.
- MARIANO M, SPECTOR WG. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *J. Pathol.*, 113 (1): 1-19, 1974.
- MATUSHIMA ER, MARIANO M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz. J. Vet. Ani. Sci.*, 33 (1): 5-10, 1996.
- MESEGUER J, ESTEBAN MA, LÓPEZ-RUIZ A, BIELEK E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). *Anat. Rec.*, 239(4): 468-474, 1994.
- MEHRIM AI. Effect of dietary supplementation of Biogen® (Commercial Probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stock densities. *J. Fish. Aqua. Sci.*, 4 (6): 261-273, 2009.
- MORGAN JD, IWANA GK. Measurements of stressed states in the field In: Iwana, G.W., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 247-270. 1997.
- MÜLLER C, MCINTYRE M. HANSEN K, NIELSEN J. Metabolic engineering of morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (4): 1827-1836, 2002.
- NAYAK SK. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2-14, 2010.
- NEWAJ-FYZUL A, ADESIYUN AA, MUTANI A, RAMSUBHAG A, BRUNT J, e AUSTIN B. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.*, 103: 1699-1706, 2007.
- OLIVEIRA MN, SIVIERI K, ALEGRO JHA. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Braz. J. Pharma. Sci.*, 38 (1): 1-21, 2002.

- ORTUÑO J, CUESTA A, RODRÍGUEZ A. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 85: 41–50, 2002.
- PICKERING AD. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111 : 51-63, 1993.
- PIRARAT N, KOBAYASHI T, KATAGIRI T, MAITA M, ENDO M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 113: 339-347, 2006.
- RAWLING MD, MERRIFIELD DL, DAVIES SJ. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture*, 194: 118-122, 2009.
- REID SG, BERNIER NJ, PERRY SF. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine and release. *Comp. Bioch. Physiol., Part C*, 120:1-27, 1998.
- RUTHERFURD-MARKWICK KJ, GILL HS. Probiotics and immunomodulation. *In*: HUGHES DA , DARLINGTON LG, BENDICH A , editors. Diet and human immune function. Totowa, NJ: Humana Press; 327-344. 2004.
- SAKAI M, Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63–92, 1999.
- SANDERS ME. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Intern. Dairy J.*, 8(5-6): 341-347, 1998.
- SCHIFFRIN EJ, BRASSART D, SERVIN AL, ROCHAT F, DONNET-HUGHES A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nut.*, 66: 515-520, 1997.
- SECOMBES CJ. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In*: Stolen J, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Van Muiswinkel WB. (Eds). Techniques in fish immunology. Fair Haven: SOS Publications, 137-154. 1990.
- SHARIFUZZAMAN SM e AUSTIN B. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.*, 27: 440–445, 2009.
- SILVEIRA R e RIGORES C. Características hematológicas normales de *Oreochromis aureus* en cultivo. *Rev. Latin. Am. Acuic.*, 39: 54-56, 1989.
- SIWICKI AK, ANDERSON DP, RUMSEY GL. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 41: 125–139, 1994.

- SOPINSKA A. Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns.III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. *Acta Ichth.*, 15: 141-165, 1985.
- SUZUKI U, IIDA T. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 149–160. 1992.
- TANNOCK GW. Probiotics: a critical review. Horizon Scientific Press, Norfolk, United Kingdom. 1999.
- TOURNOT J. Applications of probiotics to animal husbandry. *Rev. Sci. Tech. l'OIE*, 8 (2): 533–566, 1989.
- TRENZADO CE, CARRICK TR e POTTINGER TG. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 133: 332-340, 2003.
- UEDA IK, EGAMI MI, SASSO WS, MATUSHIMA ER. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, 34(5):. 270-275, 1997.
- VIJAYAN MM, MOON, TW. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.*, 72: 379–386, 1994.
- VIJAYAN MM, BALLANTYNE JS e LEATHERLAND JF. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82: 476-486, 1991.
- WAGNER GN, SINGER TD, MCKINLEY RS. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.*, 34: 1139-1146, 2003.
- WEDEMEYER GA. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, p.35-71. 1997.
- WEISS G, RASMUSSEN S, ZEUTHEN LH, NIELSEN BN, JARMER H, JESPERSEN L, ROKIAER H. *Lactobacillus acidophilus* induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a toll-like receptor-2-dependent mechanism. *Immunology*, 131(2): 268–281, 2010.
- WELLS RMG, PANKHURST NW. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. *J. W. Aquac. Soc.*, 30: 276-284, 1999
- WENDELAAR BONGA SE. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625, 1997.

WIEGERTJES GF, STET RJM, PARMENTIER SK, MUISWINKEL WB. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Dev. Comp. Immunol.*, 20 (65): 365-381,1996.

YOUNG KM e MEADOWS RL. Eosinophils and their disorders. Cap. 43. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, 6a. Ed. Blackwell Publishing Ltda. 1206p. 2010.

ZAR JH. Biostatistical Analysis. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, pp. 576. 2009.

Tabela 1. Valores médios da série vermelha do sangue (RBC = Eritrócitos, Ht = hematócrito, Hb = Hemoglobina), índices hematimétricos (VCM = Volume Corpuscular Médio e CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e Proteína plasmática (Pt) de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental com níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) na dieta contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

	Dia 1							Dia 3						
	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)		
Controle	1,52±0,27	29,02± 1,17	7,74±0,62	159,8±35,4	26,76±2,08	4,43±0,53	1,78±0,19	28,94± 3,24	8,01±0,86	192,8±26,9	28,20±6,06	5,03±0,51		
T1	1,50±0,20	31,30± 4,87	8,08±0,77	114,9±48,0	26,15±3,70	4,69±0,46	2,03±0,29	30,61± 1,69	8,20±0,67	168,9±22,1	26,77±2,51	4,60±0,44		
T2	1,64±0,27	31,5± 3,17	8,54±0,76	191,8±40,2	27,03±3,77	5,12±0,48	2,04±0,29	31,41± 1,82	8,30±,69	173,4±29,5	26,64±2,7	4,58±0,40		

	Dia 7							Dia 14						
	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)		
Controle	1,88±0,35	28,69± 3,53	7,40±0,76	189,6±32,4	26,36±3,47	4,88±0,64	1,70±0,20	27,25± 3,49	7,32±0,90	154,7±28,3	27,35±4,49	5,03±0,51		
T1	2,04±0,35	30,88± 2,35	7,89±1,54	151,1±28,6	25,54±3,91	4,91±0,57	1,84±0,33	31,17± 3,94	8,29±0,97	167,8±38,9	27,34±2,41	4,99±0,92		
T2	2,11±0,20	33,91± 2,41	7,98±0,52	160,1±23,3	23,65±1,39	5,29±0,53	1,85±0,34	32,57± 4,60	8,44±0,49	178,6±37,0	26,27±3,76	4,8±0,61		

*Médias nas colunas seguidas por letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

Tabela 2. Valores médios da contagem diferencial da série branca do sangue (Leu = Leucócitos, Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Bas = Basófilos, Eos = Eosinófilos) de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Dia 1										
	Leu (mm ³)	Lin (10 ³ .µL ⁻¹)	Neu (10 ³ .µL ⁻¹)	Mon (10 ³ .µL ⁻¹)	Bas (10 ³ .µL ⁻¹)	Eos (10 ³ .µL ⁻¹)	Leu (mm ³)	Lin (10 ³ .µL ⁻¹)	Neu (10 ³ .µL ⁻¹)	Mon (10 ³ .µL ⁻¹)
Controle	92,35±47,6	55,29±3,14	8,24±1,12 ^a	8,38±1,18	0,68±0,12 ^a	0,26±0,09	41,27±10,5	71,67±3,53 ^b	5,17±0,76	7,72±0,91
T1	83,76±29,1	55,03±3,09	5,28±0,59 ^{ab}	8,36±0,95	0,36±0,13 ^{ab}	0,33±0,17	36,77±9,05	82,5±1,68 ^a	5,86±0,74	9,56±1,05
T2	74,94±19,7	49,91±2,72	3,53±0,91 ^b	10,62±0,98	0,12±0,06 ^b	0,21±0,07	41,55±10,1	83,92±1,16 ^a	6,17±0,66	9,00±0,95

Dia 3										
	Leu (mm ³)	Lin (10 ³ .µL ⁻¹)	Neu (10 ³ .µL ⁻¹)	Mon (10 ³ .µL ⁻¹)	Bas (10 ³ .µL ⁻¹)	Eos (10 ³ .µL ⁻¹)	Leu (mm ³)	Lin (10 ³ .µL ⁻¹)	Neu (10 ³ .µL ⁻¹)	Mon (10 ³ .µL ⁻¹)
Controle	37,72±10,5	81,75±1,31	8,64±0,88	8,97±0,69	0,17±0,08	0,69±0,14 ^a	49,27±14,1	84,81±2,09	6,78±1,49	7,56±0,88 ^a
T1	34,61±7,77	83,72±1,77	7,72±1,42	7,86±0,67	0,08±0,05	0,42±0,12 ^{ab}	54,27±11,5	89,97±0,70	5,17±0,42	5,11±0,53 ^b
T2	45,11±8,02	84,17±1,09	8,03±0,76	7,39±0,72	0,05±0,04	0,28±0,06 ^b	60,75±11,1	88,13±0,75	5,57±0,31	5,77±0,63 ^{ab}

Dia 14										
	Leu (mm ³)	Lin (10 ³ .µL ⁻¹)	Neu (10 ³ .µL ⁻¹)	Mon (10 ³ .µL ⁻¹)	Bas (10 ³ .µL ⁻¹)	Eos (10 ³ .µL ⁻¹)	Leu (mm ³)	Lin (10 ³ .µL ⁻¹)	Neu (10 ³ .µL ⁻¹)	Mon (10 ³ .µL ⁻¹)
Controle	37,72±10,5	81,75±1,31	8,64±0,88	8,97±0,69	0,17±0,08	0,69±0,14 ^a	49,27±14,1	84,81±2,09	6,78±1,49	7,56±0,88 ^a
T1	34,61±7,77	83,72±1,77	7,72±1,42	7,86±0,67	0,08±0,05	0,42±0,12 ^{ab}	54,27±11,5	89,97±0,70	5,17±0,42	5,11±0,53 ^b
T2	45,11±8,02	84,17±1,09	8,03±0,76	7,39±0,72	0,05±0,04	0,28±0,06 ^b	60,75±11,1	88,13±0,75	5,57±0,31	5,77±0,63 ^{ab}

*Médias nas linhas seguidas por letras minúsculas representam diferenças entre tratamentos no mesmo dia de observação pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

Tabela 3 - Valores médios da contagem de trombócitos (10³.µL⁻¹) de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 14
Controle	26,97±3,16	14,39±3,1	29,5±10,43	11,5±1,49 ^b
T1	30,64±3,56	1,14±0,82	26,95±5,23	17,08±1,43 ^a
T2	35,59±3,08	0,01±0,00	11,31±2,06	22,03±1,91 ^a

*Médias nas linhas seguidas por letras minúsculas representam diferenças entre tratamentos no mesmo dia de observação pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

TABELA 4. Valores médios e resultado da análise de variância da contagem de células nas laminúlas após o implante em tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

t (dias)	Trat/nº núcleos	Número de núcleos						
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	> 20	Cel. Lang
Dia 3	controle	0,5 ^B ±0,61	0,44±0,51	0,11±0,32	0,0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
	T1	1,66 ^A ±0,61	0,38±0,50	0,22±0,42	0,05±0,23	0±0,0	0,11±0,32	0±0,0
	T2	1,22 ^A ±0,64	0,66±0,48	0,22±0,42	0,105±0,0	0±0,0	0,16±0,32	0±0,0
Pr>F		0,0015	0,2202	0,6263	0,375	0	0,223	0
Dia 7	controle	1,38 ^B ±0,77	1,27±0,57	0,72 ^B ±0,66	0,27 ^B ±0,46	0,16 ^B ±0,38	0,22±0,42	0,22±0,42
	T1	2,00 ^{AB} ±0,84	1,61±0,69	1,27 ^A ±0,67	1,05 ^A ±0,53	0,44 ^{AB} ±0,51	0,44±0,51	0,33±0,48
	T2	2,27 ^A ±0,75	1,66±0,59	1,28 ^A ±0,66	0,77 ^A ±0,64	0,72 ^A ±0,57	0,5±0,51	0,55±0,51
Pr>F		0,0047	0,1403	0,0216	0,0004	0,0061	0,2031	0,1117
Dia 14	controle	1,88 ^B ±0,75	1,61±0,60	0,94±0,72	0,61±0,77	1,05±0,51	0,72±0,46	0,38 ^B ±0,5
	T1	2,00 ^{AB} ±0,84	1,66±0,59	0,72±0,46	0,72±0,46	0,66±0,59	0,68±0,46	0,67 ^{AB} ±0,48
	T2	2,61 ^A ±1,03	1,61±0,60	1,11±0,47	0,88±0,58	0,83±0,38	0,77±0,46	0,83 ^A ±0,38
Pr>F		0,039	0,950	0,13	0,41	0,70	0,7688	0,0189

*Médias nas colunas seguidas por letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre tratamentos no mesmo dia de observação pelo teste de Tukey (P<0,05). ** Pr>F = Probabilidade de significância de F. Para cada variável, n=30.

Tabela 5. Valores médios do número de eritrócitos (RBC), porcentagem de hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb) e Proteínas totais (Pt) de juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de laminulas de vidro em tecido subcutâneo.

Dia 1										
	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	Pt (g.dL ⁻¹)
Controle	154,5± 5,43	28,8± 1,68	7,74 ^B ± 0,30	195,3± 15,0	26,76± 1,96	4,43± 0,8	178,26 ^B ± 9,8	29,2 ^B ± 3,72	8,08± 0,84	26,66± 3,59
T1	153,6± 66,0	30,1± 1,44	7,73 ^{AB} ± 0,31	194,8± 16,0	26,93± 1,35	4,72± 0,2	203,7 ^A ± 26,0	30,6 ^{AB} ± 3,4	8,15± 0,84	27,65± 4,13
T2	165,9± 59,0	31,5± 1,79	8,43 ^A ± 1,13	197,2± 19,3	28,27± 2,37	5,12± 0,3	204,27 ^A ± 6,0	31,4 ^A ± 4,47	8,08± 0,92	26,52± 4,90
Dia 3										
	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	Pt (g.dL ⁻¹)
Controle	154,5± 5,43	28,8± 1,68	7,74 ^B ± 0,30	195,3± 15,0	26,76± 1,96	4,43± 0,8	178,26 ^B ± 9,8	29,2 ^B ± 3,72	8,08± 0,84	26,66± 3,59
T1	153,6± 66,0	30,1± 1,44	7,73 ^{AB} ± 0,31	194,8± 16,0	26,93± 1,35	4,72± 0,2	203,7 ^A ± 26,0	30,6 ^{AB} ± 3,4	8,15± 0,84	27,65± 4,13
T2	165,9± 59,0	31,5± 1,79	8,43 ^A ± 1,13	197,2± 19,3	28,27± 2,37	5,12± 0,3	204,27 ^A ± 6,0	31,4 ^A ± 4,47	8,08± 0,92	26,52± 4,90
Dia 7										
	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	Pt (g.dL ⁻¹)
Controle	188,29± 24,0	28,6 ^C ± 4,34	7,50± 1,02	157,4± 3,46	23,65± 3,78	4,87± 0,64	169,59± 20,3	25,6 ^B ± 5,91	7,39 ^B ± 1,68	26,01± 3,43
T1	208,73± 20,5	31,1 ^B ± 3,24	7,94± 1,36	152,8± 2,18	25,84± 3,67	4,88± 0,5	187,1± 21,32	32,0 ^A ± 3,81	8,51 ^A ± 0,65	27,37± 2,53
T2	211,78± 26,6	33,9 ^A ± 4,26	8,00± 1,3	161,9± 3,89	26,64± 2,85	5,29± 0,5	183,56± 42,3	32,4 ^A ± 5,3	8,40 ^A ± 1,10	27,33± 3,97
Dia 14										
	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (%)	Pt (g.dL ⁻¹)	RBC(10 ⁶ .µL ⁻¹)	Ht (%)	Hb (g.dL ⁻¹)	Pt (g.dL ⁻¹)
Controle	188,29± 24,0	28,6 ^C ± 4,34	7,50± 1,02	157,4± 3,46	23,65± 3,78	4,87± 0,64	169,59± 20,3	25,6 ^B ± 5,91	7,39 ^B ± 1,68	26,01± 3,43
T1	208,73± 20,5	31,1 ^B ± 3,24	7,94± 1,36	152,8± 2,18	25,84± 3,67	4,88± 0,5	187,1± 21,32	32,0 ^A ± 3,81	8,51 ^A ± 0,65	27,37± 2,53
T2	211,78± 26,6	33,9 ^A ± 4,26	8,00± 1,3	161,9± 3,89	26,64± 2,85	5,29± 0,5	183,56± 42,3	32,4 ^A ± 5,3	8,40 ^A ± 1,10	27,33± 3,97

*Médias nas colunas seguidas por letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

Tabela 6. Valores médios da contagem diferencial da série branca do sangue (Leu = Leucócitos, Lin = Linfócitos, Neu = Neutrófilos, Mon = Monócitos, Bas = Basófilos, Eos = Eosinófilos) de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de laminulas de vidro em tecido subcutâneo.

Dia 1											
	Leu (mm ³)	Lin(10 ³ .µL ⁻¹)	Neu(10 ³ .µL ⁻¹)	Mon(10 ³ .µL ⁻¹)	Bas(10 ³ .µL ⁻¹)	Eos(10 ³ .µL ⁻¹)	Leu (mm ³)	Lin(10 ³ .µL ⁻¹)	Neu(10 ³ .µL ⁻¹)	Mon(10 ³ .µL ⁻¹)	Eos(10 ³ .µL ⁻¹)
Controle	110,58± 26,2	58,88± 33,39	15,43 ^A ± 8,49	16,77± 10,08	0,0	0,53± 0,06	141,0 ^B ±29,92	72,61± 43,79	12,05± 6,48	15,88± 7,74	0,0
T1	106,85± 26,2	54,27± 23,36	10,64 ^{AB} ± 4,9	17,21± 8,086	0,0	0,79± 0,41	163,9 ^A ± 14,2	57,83± 34,82	11,78± 6,23	20,43± 8,89	0,0
T2	99,82± 22,45	52,33± 10,83	7,05 ^B ± 3,52	21,24± 8,089	0,0	0,41± 0,06	168,0 ^A ± 9,90	64,67± 23,89	10,5± 5,57	18,06± 8,08	0,0

Dia 3											
	Leu (mm ³)	Lin(10 ³ .µL ⁻¹)	Neu(10 ³ .µL ⁻¹)	Mon(10 ³ .µL ⁻¹)	Bas(10 ³ .µL ⁻¹)	Eos(10 ³ .µL ⁻¹)	Leu (mm ³)	Lin(10 ³ .µL ⁻¹)	Neu(10 ³ .µL ⁻¹)	Mon(10 ³ .µL ⁻¹)	Eos(10 ³ .µL ⁻¹)
Controle	164,94± 11,1	70,06± 39,54	16,78± 7,49	16,06± 5,88	0,0	1,29± 1,09	168,88± 17,7	57,44± 32,56	13,93± 12,65	15,41± 7,42	0,0
T1	164,42± 15,0	72,78± 38,92	16,62± 12,06	17,14± 5,69	0,0	0,93± 0,09	178,28± 6,04	53,11± 13,31	11,17± 3,83	11,29± 3,85	0,0
T2	168,41± 6,04	81,27± 28,18	16,23± 3,83	14,47± 6,07	0,0	0,59± 0,0	177,11± 6,24	59,26± 12,29	10,28± 2,63	10,53± 5,38	0,0

Dia 14											
	Leu (mm ³)	Lin(10 ³ .µL ⁻¹)	Neu(10 ³ .µL ⁻¹)	Mon(10 ³ .µL ⁻¹)	Bas(10 ³ .µL ⁻¹)	Eos(10 ³ .µL ⁻¹)	Leu (mm ³)	Lin(10 ³ .µL ⁻¹)	Neu(10 ³ .µL ⁻¹)	Mon(10 ³ .µL ⁻¹)	Eos(10 ³ .µL ⁻¹)
Controle	164,94± 11,1	70,06± 39,54	16,78± 7,49	16,06± 5,88	0,0	1,29± 1,09	168,88± 17,7	57,44± 32,56	13,93± 12,65	15,41± 7,42	0,0
T1	164,42± 15,0	72,78± 38,92	16,62± 12,06	17,14± 5,69	0,0	0,93± 0,09	178,28± 6,04	53,11± 13,31	11,17± 3,83	11,29± 3,85	0,0
T2	168,41± 6,04	81,27± 28,18	16,23± 3,83	14,47± 6,07	0,0	0,59± 0,0	177,11± 6,24	59,26± 12,29	10,28± 2,63	10,53± 5,38	0,0

*Médias nas linhas seguidas por letras minúsculas representam diferenças entre tratamentos no mesmo dia de observação pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

Tabela 7 - Valores médios da contagem de trombócitos (10³.µL⁻¹) de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dieta experimental e níveis de inclusão de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de laminulas de vidro em tecido subcutâneo.

	Dia 1			Dia 3			Dia 7			Dia 14		
Controle			53,94± 26,39			30,47 ^A ± 26,30			56,24± 28,52			23,24 ^B ± 12,62
T1			63,86± 30,19			1,93 ^B ± 0,99			58,86± 44,36			36,21 ^A ± 12,26
T2			71,18± 25,35			0,1 ^B ± 0,00			22,71± 17,48			39,41 ^A ± 15,61

*Médias nas linhas seguidas por letras minúsculas representam diferenças entre tratamentos no mesmo dia de observação pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

TABELA 8. Valores médios de cortisol e glicemia plasmática de juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5 g.kg⁻¹, T2 = 10 g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, e submetidas ao processo inflamatório induzido pelo implante de lâminulas de vidro em tecido subcutâneo.

t(dias)/Trat ¹	Cortisol (µg.dL ⁻¹)			Glucose (µg.dL ⁻¹)		
	controle	T1	T2	controle	T1	T2
0	17,68± 0,55	22,93± 2,65	32,15± 12,55	38,21± 0,54	39,05± 0,75	38,87± 1,24
3	35,43 ^A ± 0,81	38,95 ^A ± 0,85	28,95 ^B ± 0,65	68,72 ^A ± 1,46	49,82 ^B ± 1,42	51,34 ^B ± 1,14
7	47,35 ^A ± 0,87	35,42 ^{AB} ± 0,73	30,04 ^B ± 0,49	52,31 ^A ± 2,40	40,84 ^B ± 1,37	39,95 ^B ± 1,30
14	28,08± 1,26	34,47± 1,29	32,46± 2,02	42,33± 0,55	41,77± 0,78	42,08± 0,43

* Médias nas linhas seguidas por letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). Para cada variável, n=30.

Capítulo 3

FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY

PROBIÓTICOS PARA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* SUBMETIDAS AO DESAFIO COM *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus iniae*

Resumo

Foi estudado o potencial probiótico (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*) sobre os parâmetros imunes e proteção contra *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus iniae*. 720 peixes foram distribuídos em 45 aquários, em grupos de 16 peixes. Os peixes foram alimentados por 30 dias com as rações experimentais: 0g de probiótico (Controle), 5g (T1) e 10g (T2) por kg, com cinco réplicas. Colheitas de sangue foram realizadas nos dias três, sete e 14 do início da alimentação. Foram avaliados hemograma e fragilidade eritrocitária. Com o plasma foram analisadas glicemia, cortisol, proteínas totais, e destas, albumina e globulinas. O estado imunológico foi considerado através da quantificação de espécies reativas de oxigênio. Os peixes foram infectados através de inoculação em cavidade abdominal com *A. hydrophila* (2×10^6 mL⁻¹ UFC) e *S. iniae* (1×10^4 mL⁻¹ UFC) e observados durante 21 dias. Os resultados não mostram alterações nos parâmetros hematológicos. Ocorreu aumento na glicemia e no cortisol nos peixes do grupo controle, e como consequência, aumento no RBC, mostrando que o probiótico suprimiu os efeitos do estresse do experimento em T1 e T2. Além disso, a suplementação probiótica garantiu aos eritrócitos maior resistência à hemólise. Os peixes de T1 e T2 apresentaram maior atividade de espécies reativas de oxigênio, o que lhes determinou aumento na imunidade inata. Maiores taxas de mortalidade causada pela infecção foram observadas nos peixes do grupo controle. O probiótico, nas doses de 5 e 10 g.kg⁻¹ garantiu maior sobrevivência para as tilápias contra *A. hydrophila* e 10 g.kg⁻¹ contra *S. iniae*.

Palavras-chave: desafio bacteriano, imunidade inata, probióticos, sobrevivência.

PROBIOTICS FOR NILE TILAPIAS, *Oreochromis niloticus* CHALLENGED WITH *Aeromonas hydrophila* AND *Streptococcus iniae*

Abstract

It was studied the probiotic potential (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*) on immune parameters and protection against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae*. 720 fishes were distributed in 45 tanks, in groups of 16. The fish were fed for 30 days with experimental diets: 0g probiotic (Control), 5g (T1) and 10 (T2) per kg, with five replicates. Blood samples were taken on days three, seven and 14 of beginning feed. Hemogram and erythrocyte fragility were evaluated. With the plasma, glucose, cortisol, total protein were analyzed and with these, albumin and globulins. The immune status was considered by reactive oxygen species quantification. Fish were infected by inoculation into the abdominal cavity with *A. hydrophila* (2×10^6 CFU mL⁻¹) and *S. iniae* (1×10^4 mL⁻¹ CFU) and observed for 21 days. The results show no changes in hematological parameters. There was an increase in blood glucose and cortisol in control group fishes, and as a consequence, increase in RBC, showing that the probiotic stress suppression in T1 and T2. In addition, probiotic supplementation increased erythrocytes resistance to hemolysis. T1 and T2 fishes showed higher reactive oxygen species activity, which caused an innate immunity increase. Higher mortality rates caused by infection were observed in fish in the control group. The probiotic, at doses of 5 and 10 g.kg⁻¹ ensured higher survival for tilapia against *A. hydrophila* and 10 g.kg⁻¹, against *S. iniae*.

Keywords: bacterial challenge, innate immunity, probiotics, survival.

Introdução

Organismos aquáticos em sistemas de produção intensiva estão expostos a condições de estresse, doenças e deterioração das condições do ambiente, o que leva a grandes perdas econômicas (SUBASINGHE, 1997; FAO, 2004; ALY et al., 2008a).

Infecções bacterianas são consideradas a maior causa de mortalidade em pisciculturas (GRISEZ e OLLEVIER, 1995). A prevenção e o tratamento de doenças infectocontagiosas em animais aquáticos incluem um escasso número de antibióticos, quimioterápicos e uma quantidade limitada de vacinas (ALY et al., 2008a), que não devem ser utilizadas como meio único de prevenção à doenças (AMÁBILE-CUEVAS et al., 1995; GRAM, et al., 2001). Além disso, o uso de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes e podem modular a resposta imune (LUNDÉN et al., 2002; ALY et al., 2008a).

Esta crescente preocupação na aquicultura levou ao aparecimento de novas medidas para o controle de doenças (GRAM et al., 2001). Uma alternativa promissora para o controle de doenças em peixes é o uso de probióticos que controlem os patógenos através de uma variedade de mecanismos (GATESOUBE, 1991; ROBERTSON et al., 2000; OLVERA et al., 2001; IRIANTO e AUSTIN, 2002; ALY et al., 2008a).

Um considerável interesse no uso de microorganismos probióticos têm se desenvolvido, com a finalidade de se aumentar a resistência às doenças, o crescimento dos peixes e melhorar a qualidade da água na produção (BOYD e MASSAUT, 1999; VERSCHUERE et al., 2000; MOHAMED e REFAT, 2011). A eficácia dos probióticos em termos de proteção contra agentes infecciosos é muitas vezes atribuída ao aumento da imunidade (NAYAK, 2010).

Dentre os probióticos utilizados em aquicultura, destacam-se os do gênero *Bacillus*, as leveduras e fungos. O *Bacillus subtilis* comprovadamente possui características anti-tumorais e de imuno-modulação. Além disso, atua como promotor de crescimento, garante a viabilidade de bactérias ácido lácticas no trato gastro intestinal (HOA et al., 2000), melhora a qualidade da água de cultivo (DE SOUZA et al., 1996) e influencia a sobrevivência quando os animais são exposição de patógenos (RAIDA et al., 2003; ALY et al., 2008b).

Saccharomyces cerevisiae é um promotor de crescimento (LARA-FLORES et al., 2003; ABDEL-TAWWAB et al., 2008) que contém muitos compostos

imunomodulatórios como os beta glucanos, mananooligossacarídeos e ácidos nucléicos que estimulam as respostas imunes. (SIWICK et al., 1990; SAKAI, 1999; ORTUÑO et al., 2002). *Aspergillus oryzae* na alimentação possui características de aumentar a digestibilidade dos nutrientes (BEHARKA e NAGARAJA, 1998; HAN et al., 1999; DI FRANCIA et al., 2008), através da fermentação de alimentos funcionais para beneficiar o hospedeiro (HONG et al., 2004).

O presente estudo foi realizado para avaliar a eficiência de três microorganismos como potenciais probióticos para tilápia do Nilo e seu efeito na resposta imune, sobrevivência e possível proteção contra *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus iniae*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças de Peixes do Departamento de Fisheries and Allied Aquacultures, da Universidade de Auburn, AL, EUA. Juvenis de tilápia do Nilo, com peso médio de 25g, foram distribuídos em grupos de 16 peixes em 45 aquários de 40L cada, totalizando 720 peixes. O sistema possuía aeração contínua externa, temperatura controlada e renovação contínua de água.

Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia, até a saciedade, por 30 dias. As dietas continham ração comercial para tilápia (PB 28%) sendo que 15 aquários receberam a dieta controle, sem probiótico; 15 aquários receberam a dieta T1, com 5 g.kg⁻¹ de probiótico; e 15 aquários receberam a dieta T2 com 10 g.kg⁻¹ de probiótico.

Colheitas de sangue foram realizadas nos dias três, sete e 14 após o início da alimentação. Os peixes foram anestesiados com solução de MS-222 (Tricaína metano sulfonato) e colheitas de sangue foram realizadas através da punção do vaso caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas. Foram avaliados: número total de células (RBC), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), e cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Alíquotas de sangue foram adicionadas a soluções de NaCl (10 g.L⁻¹) em concentrações crescentes para cálculo da fragilidade eritrocitária, avaliada como

a taxa de hemólise das hemácias segundo metodologia de SECOMBES (1990) modificada por GUIMARÃES (2009).

Para as análises de espécies reativas de oxigênio, 2 peixes de cada aquário foram escolhidos aleatoriamente ao 2º, 6º e 13º dia após o início da alimentação com a suplementação probiótica e injetados intraperitonealmente com 0.25mL de esqualeno (Sigma Chemical) como atratante para macrófagos. Após 24hs, os peixes foram mortos por aprofundamento anestésico e a cavidade celomática foi aberta e lavada com solução salina de tampão fosfato (PBS) para obtenção do exsudato. O fluido peritoneal dos peixes do mesmo aquário foram combinados e centrifugados. O sobrenadante descartado, e os péletes foram ressuspensos em 1mL de solução de Hank (HBSS) sem phenol red (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA).

O número de macrófagos em cada amostra foi contado por meio de coloração e enumerado em hemocítômetro para determinação da produção de ânion superóxido. Para tanto, foi medida através da redução do nitroblue tetrazolium (NBT), segundo metodologia de SECOMBES (1990) modificada por GUIMARÃES (2009). Quatro monocamadas de leucócitos, contendo macrófagos foram adicionadas à microplacas, na quantidade de 10^6 células/poço. Os macrófagos foram incubados à temperatura ambiente em câmara umidificada e após este período, os poços foram lavados e foi adicionado solução de NBT. Metanol foi adicionado para parar a reação de redução, e as placas foram lavadas e deixadas para secar a temperatura ambiente. Aos poços, foram adicionados KOH 2M e DMSO. As placas incubadas foram lidas em densidade colorimétrica de 630nm, usando KOH/DMSO como referência.

O sangue restante foi centrifugado para obtenção do plasma para a realização das análises de cortisol por ELISA e glicemia, por meio de kit comercial.

A proteína plasmática total (Pt) foi determinada em refratômetro manual Goldberg utilizando o plasma contido no capilar para microhematócrito após leitura do hematócrito (FELDMAN et al. 2000).

A análise do teor de albumina do plasma foi realizada com base no método colorimétrico do verde de bromocresol utilizando kit comercial (GUIMARÃES, 2009). A fração globulina do plasma foi determinada pela diferença entre a Pt e a albumina (GUIMARÃES, 2009).

Após 30 dias de alimentação, cepas virulentas de *A. hydrophila* (2×10^6 mL⁻¹ UFC) e de *S. iniae* (1×10^4 mL⁻¹ UFC) foram cultivadas e inoculadas nos peixes de 5

aquários de cada tratamento, totalizando 15 aquários para cada espécie de bactéria, e em 5 aquários de cada tratamento, solução fisiológica foi inoculada intraperitonealmente (IP) nos peixes. A avaliação da sobrevivência foi efetuada duas vezes ao dia, juntamente com a alimentação dos animais por 21 dias consecutivos.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e normalidade (ZAR, 2009). Os valores médios foram submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias ($P < 0,05$). Para avaliação das análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico SAS (Statistical Analyses System) versão 9.2.

Resultados e discussão

Os valores de RBC no grupo controle foram maiores (Tabela 1), porém nenhuma alteração fisiológica foi constatada, como por exemplo, a hiperventilação e/ou mudanças comportamentais. É possível que o dado encontrado seja reflexo do estado nutricional anterior ao experimento. No 14º dia, o grupo T1 apresentou maiores valores de RBC, assim como Ht, sem alterações no VCM. Os resultados indicam uma maior quantidade de células circulantes sem alterações morfológicas nas mesmas, uma vez que o parâmetro indica o volume celular.

Em *Carassius auratus* alimentados com suplementos herbais foram encontrados resultados semelhantes por HARIKRISHNAN et al. (2010). Estes dados revelam que a suplementação com o probiótico foi segura na alimentação dos peixes além de melhorar o seu estado de saúde (ALY et al., 2008b).

As taxas de Hb e a CHCM neste experimento estavam dentro da normalidade da espécie e demonstra que a inclusão de níveis de probiótico não exerceu influência na quantidade de Hb intra-eritrocitária (Tabela 1). Tilápias vermelhas alimentadas com probiótico comercial demonstraram resultados semelhantes (RAWLING et al., 2009).

No 7º dia, os valores de glicose mostrou-se elevado em T1 ($P < 0,05$). Os valores de cortisol plasmático não mostraram diferenças entre os tratamentos, entretanto, o grupo controle apresentou maiores quantidades de cortisol plasmático à partir do 7º dia de ensaio.

Este aumento na glicemia e no cortisol foram reflexos ao estresse do experimento. A elevação da glicemia e do cortisol nos peixes influenciou a

eritropoiese no grupo controle e T1, uma vez que o hormônio influencia na produção de eritrócitos e na sua liberação no organismo (RANDOLPH et al., 2010). Em situações de estresse, os peixes realizam contração esplênica com a finalidade de liberar mais células vermelhas que possam oxigenar melhor os tecidos no momento da fuga (ELLSAESSER e CLEM, 1986, 1987). A suplementação probiótica exerceu influência nos níveis de cortisol circulante, suprimindo os efeitos negativos do estresse do experimento.

As quantidades de proteínas plasmáticas totais (Pt), a quantidade de albumina e globulinas não diferiram entre os peixes dos grupos distintos, entretanto, no decorrer do ensaio, as quantidades de Pt e G foram maiores nos peixes que receberam a suplementação probiótica ($P=0,31$). A proteína plasmática total refere-se à fração albumina e globulina presente no plasma e no soro sanguíneo. As quantidades de albumina no plasma é mais abundante, e também é responsável pelo transporte de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico do sangue, enquanto que a globulina está envolvida nos mecanismos de defesa do animal (THOMAS, 2000).

Durante a avaliação da fragilidade eritrocitária, foi observado no 3º dia que as hemácias dos peixes dos grupos T1 e T2 resistiram em concentração salina maior que os peixes do grupo controle, 0,70 e 0,60, respectivamente. As hemácias dos peixes que receberam o probiótico apresentaram maior resistência à hemólise que as hemácias dos peixes não suplementados (Figura 1).

No 7º dia, 50 % de hemólise foi observada para T1 e T2 em concentração próxima a 0,45, e para o grupo controle, em torno de 0,35 (Figura 2). Observou-se que os animais que não receberam a suplementação probiótica apresentaram hemácias mais frágeis. Aos 14 dias de ensaio, não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto à fragilidade eritrocitária (Figura 3).

As células em meio hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico de hemólise antes de sofrerem lise (JAIN, 1973). Desse modo, a fragilidade celular varia conforme a concentração de sal e segue uma distribuição normal em animais sadios (JAIN, 1973).

A fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas (PERK et al., 1964).

O tempo de vida da célula também é muito importante já que os eritrócitos senescentes são mais frágeis que os jovens e correspondem a aproximadamente 30% da população eritrocitária. Neste experimento, os valores de VCM estavam dentro da normalidade para a espécie e estágio do desenvolvimento, o que implica que não se tratava de células jovens. A fragilidade das hemácias expressa a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006).

Em humanos, os eritrócitos tornam-se mais resistentes quando a taxa de colesterol circulante se eleva (MAEDE, 1980). O cortisol é produzido a partir do colesterol (SILVA et al., 2000).

No presente estudo, com o passar do tempo, os níveis de cortisol circulante se elevaram, garantindo eritrócitos mais resistentes independente da suplementação probiótica. Entretanto, os animais que receberam o probiótico apresentaram maior integridade de eritrócitos que o grupo controle. A destruição de eritrócitos resulta em hipóxia, que causa graves danos e lesões celulares (CARNEIRO et al., 2007) principalmente através da liberação de radicais livres.

Os peixes dos grupos T1 e T2 apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio que o grupo controle (Tabela 2). Esta maior produção foi observada a partir do 3º dia. No 14º dia, foi observado que T2 mostrou maior produção de NO₂.

Peixes tratados com imunoestimulantes usualmente mostram maior estímulo nos mecanismos de defesa o que leva a maior produção de espécies reativas de oxigênio (SAKAI, 1999; ZHOU et al., 2009; NAYAK, 2010). A suplementação administrada não foi mais suficiente para influenciar os macrófagos dos peixes. A atividade respiratória dos leucócitos mostra a capacidade dos fagócitos em produzir espécies reativas de oxigênio com a finalidade de destruir os patógenos durante o processo de fagocitose (BASHEERA-JOHN et al., 2002).

Os macrófagos são bons modelos para o estudo das respostas imunes, por serem as células mais primitivas do sistema imune dos vertebrados e invertebrados (JENSCH-JUNIOR et al., 2006) e possuem muitas funções vitais na resistência natural à infecções (ZELIKOFF et al., 1991; SILVA et al., 2001, 2002).

A influência do probiótico na resposta imune foi observada na primeira coleta de amostras, pois atua na migração de macrófagos para o sítio de

infecção. Os macrófagos respondem ao estímulo inflamatório através do mecanismo de quimiotaxia, migrando para o local onde está o estímulo, e uma vez lá, entra em ação o mecanismo de explosão respiratória (WAKENELL, 2010).

A fagocitose e a atividade do *burst* respiratório de macrófagos ativados coletados de cavidade abdominal, mostrou-se aumentada após estímulo, como também na implantação de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo (ENANE et al., 1993), e na inoculação de outros flogógenos, como oligodeoxinucleotídeos (SAKAI, 1999) e o esqualeno, neste experimento. Entre as muitas consequências da fagocitose, a mais importante é a habilidade de eliminar patógenos (JENSCH-JUNIOR et al., 2006).

A ativação dos macrófagos em trutas arco-íris está relacionada diretamente com os fatores de ativação, como o gamma interferon, que induz o aumento da atividade do *burst* respiratório e conseqüentemente, aumenta a capacidade germicida (GRAHAM e SECOMBES, 1988).

Os peixes dos tratamentos T1 e T2, quando desafiados contra *A. hydrophila* (Figura 4) e contra *S. iniae* (Figura 5) demonstraram maiores taxas de sobrevivência ao desafio bacteriano. Sinais clínicos como natação errática foram observados algumas horas após a inoculação da bactéria patogênica, principalmente nos animais do grupo controle.

Muitos autores já relataram os efeitos positivos da administração de probióticos para o aumento da imunidade nos peixes contra patógenos bacterianos (MORIARTY, 1998; ROBERTSON et al., 2000; NEWAJ-FYZUL et al., 2007; ALY et al., 2008a; SHARIFUZZAMAN et al., 2009; MOHAMED e REFAT, 2011).

Experimentos *in vitro* mostram que o *B. subtilis* em associação com outros microorganismos, como o *L. acidophilus* foi capaz de inibir o crescimento de *A. hydrophila* (ALY et al., 2008a). Os *Bacillus* produzem polimixinas, bacitracinas e antibióticos que atuam contra o patógeno (MORIARTY, 1998). A suplementação com microorganismos probióticos como o *L. acidophilus* para tilápias (ALY et al., 2008a), *L. sakei* para *Epinephelus bruneus* (HARIKRISHNAN et al., 2010), *S. cerevisiae* para striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) (LI e GATLIN III, 2004) garantiram maiores taxas de sobrevivência em infecções induzidas com o *S. iniae*. Foi descrito que *S. cerevisiae* adicionadas à alimentação dos peixes acelera a maturação do sistema digestivo além de, em peixes adultos, estimular o metabolismo e o crescimento (GATESOUBE, 2007). Tilápias alimentadas por 60

dias com *B. subtilis* e *L. acidophilus* apresentaram maiores taxas de sobrevivência quando desafiadas contra *A. hydrophila* (ALY et al., 2008a). Trutas alimentadas por 14 dias com probiótico contendo *B. subtilis* foram mais resistentes a infecções por *A. hydrophila* que os peixes que não receberam a mesma suplementação (NEWAJ-FYZUL et al., 2007).

A atividade antimicrobiana exercida através da suplementação com probióticos, pode ser atribuída ao fato do *B. subtilis* e da *S. cerevisiae* serem estimulados a competir por nutrientes com outras bactérias de crescimento rápido no interior do trato gastro-intestinal dos peixes (GATESOUBE, 2007, ALY et al., 2008b).

O fornecimento do probiótico levou à proteção contra doenças através da estimulação de parâmetros imunes (RINGØ et al., 1998; RUSSO et al., 2006; ABDEL-TAWWAB et al., 2008; SHARIFUZZAMAN e AUSTIN, 2009). Os resultados deste estudo sugerem que doses maiores do probiótico incorporadas na alimentação promoveram taxas de sobrevivência maiores e melhorias na imunidade não específica.

Conclusão

O fornecimento do probiótico contendo *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* promoveu a melhora na imunidade inespecífica dos peixes. Doses de 5 e 10 g de probiótico garantiu o aumento nas taxas de sobrevivência de peixes expostos à infecção por *A. hydrophila* e 10g de probiótico por kg de ração garantiu maior sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo contra *S. iniae*.

Agradecimentos

À Biogen por fornecer o probiótico. À CAPES, pela bolsa concedida. À Universidade de Auburn, por ceder o laboratório, cepas patogênicas e financiar os experimentos realizados. À M.Sc. Theresa Wood e ao Prof. Ph.D. Jeff Terhune pelo auxílio e orientação nos experimentos.

Referências bibliográficas

ABDEL-TAWWAB M, ABDEL-RAHMAN AM, ISMAEL NEM. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia,

- Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 2008; 280: 185-189.
- ALDRICH K, SAUNDERS DK. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. J Thermal Biol 2006 ; 26 :179-182.
- ALY SM, AHMED YA, AZIZ AAG, MOHAMED MF. 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 Shell Immunol 2008a ; 25: 128-136.
- ALY SM, MOHAMED MF, JOHN G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). Aquac Res 2008b; 39 (6): 647-656.
- AMÁBILE-CUEVAS C, GÁRDENAS-GARCÍA M, LUDGAR M. Antibiotic resistance. Am Sci 1995; 83: 320–329.
- BASHEERA-JOHN MCH, ANDRAN MR, ARUNA BV, ANBA RASU K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunized with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. Fish Shell Immunol 2002;12: 201-207.
- BEHARKA AA e NAGARAJA TG. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. J Dairy Sci 1998; 81:1591-1598.
- BOYD CE, MASSAUT L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquac Engen1999; 20:113-132.
- CARNEIRO G, RIBEIRO FILHO FF, TOGEIRO SM, TUFIK S, ZANELLA MT. Interações entre síndrome da apnéia obstrutiva do sono e resistência à insulina. Arq Bras Endoc Metabol 2007; 51(7): 1035-1040b.
- DE-SOUZA M, NAIR S, DAVID J, CHANDRAMOHAN D, Crude oil degradation by phosphate-solubilizing bacteria. J Marine Biotech 1996 ; 4(2):91–95.
- DI FRANCIA A, MASUCCI F, DE ROSA G. Effects of *Aspergillus oryzae* extract and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. An Feed Sci Techn 2008 ; 140:67-77.
- ELLSAESSER CF, CLEM LW. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. J Fish Biol 1986; 28:511-521.
- ELLSAESSER CF, CLEM LW. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comp Bioch Physiol A, Comp Physiol 1987; .87:405-408.
- ENANE NA, FRENKEL K, O'CONNOR JM. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. Immunology 1993 ; 80:68 – 72.
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture. Rome, Italy, p.14-17. 2004
- FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC, Schalm's Veterinary Hematology. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2000.

- GATESOUBE FJ. The effect of three strains of lactic acid bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture 1991; 96:335-342.
- GATESOUBE FJ. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. Aquaculture 2007; 267:20-30.
- GRAHAM S, SECOMBES CJ. The production of a macro-phage-activating factor for rainbow trout, *Salmo gairdneri* leucocytes. Immunology 1988; 65:293 – 297.
- GRAM L, LOVØLD T, NIELSEN J, MELCHIORSEN J, SPANGGAARD B. In vitro antagonism of the probionte *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture 2001; 199:1-11.
- GRISEZ L, OLLEVIER F, *Vibrio* (Listonella) *anguillarum* infections in marine fish larviculture. In: LAVENS, P., JASPERS, E., ROELANDE, L. (Eds.), Larvi 91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Euro Aquac Soc 1995; Gent. Special publication, 24: 478.
- GUIMARÃES IG. Vitamina A em dietas para tilápia do Nilo. Tese (Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal). FMVZ-UNESP, Botucatu. 92f. 2009.
- HAN SW, KW LEE, BD LEE, CG SUNG. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* culture on fecal microflora, egg qualities, and nutrient metabolizabilities in laying hens. As Austr J An Sci 1999; 12:417-421.
- HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO MS. Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. Dis Aquatic Org 2010; 46:47-55.
- HOA NT, BACCIGALUPI L, HUXHAM A. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl Environ Microbiol 2000; 66:5241-5247.
- HONG KJ, LEE CH, KIM SW. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals. J Med Food 2004; 7(4):430-435.
- IRIANTO A e AUSTIN B. Probiotics in aquaculture. J Fish Dis 2002; 25:633–642.
- JAIN NC. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. Cornell Veterinarian, v.63, p.411-423. 1973.
- JENSCH-JUNIOR BE, PRESSINOTTI LN, BORGES JCS. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Aquaculture 2006; 251:509-515.
- LARA-FLORES M, OLVEA-NOVOA MA, GUZMANMENDEZ BE. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 2003; 216 (1): 193-201.
- LI P, GATLIN III DM. Dietary brewers yeast and the probiotic Grobionic® AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture 2004; 31:445-456.

- LUNDÉN T, LILIUS E, BYLUND G. Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture* 2000; 207:203-212.
- MAEDE Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. *Jap J Vet Sci* 1980; 42(3):281-288.
- MOHAMED HM, REFAT AAGA. Pathological evaluation of probiotic *Bacillus subtilis* against *Flavobacterium columnare* in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) fish in Sharkia Governorate, Egypt. *J Am Sci* 2011; 7(2):244-256.
- MORIARTY DJW. Control of luminous *Vibrio species* in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 1998; 164 :351-358.
- NAYAK SK. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol* 2010; 29:2-14.
- NEWAJ-FYZUL A, ADESIYUN AA, MUTANI A, RAMSUBHAG A, BRUNT J, AUSTIN B. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol* 2007; 103:1699-1706.
- OLVERA MA, LARA M, GUZMAN BE, LOPEZ WG. Effect of the use of probiotics on growth of tilapia *Oreochromis niloticus* reared under stress conditions. *Aquaculture - Book of abstracts*, 2001;143, World-Aquaculture Society.
- ORTUÑO J, CUESTA A, RODRÍGUEZ A. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopath* 2002; 85:41–50.
- PERK K, FREI YF, HERZ A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. *Am J Vet Res* 1964; 25:1241-1248.
- RAIDA MK, LARSEN JL, NILSEN ME, BUCHMANN K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B.licheniformis* (BIOPLUS2B). *J Fish Dis* 2003; 26:495–498.
- RANDOLPH JF, PETERSON ME, STOKOL T. Erythrocytosis and Polycythemia, Chapter 25. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6a. Ed. Wiley-Blackwell Publications. 1206p. 2010
- RAWLING MD, MERRIFIELD DL, DAVIES SJ. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture* 2009; 194:118-122.
- RINGØ E, BENDIKSEN HR, GAUSEN SJ, SUNDSFJORD A, OLSEN RE. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *J Appl Microbiol* 1998; 85:855 – 864.
- ROBERTSON PAW, O'DOWD C, BURRELLS C, WILLIAMS P, AUSTIN B. Use *Carnobacterium* sp. as probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 2000; 185:235 –243.
- RUSSO R, MITCHELL H, YANONG RPE. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture* 2006; 256:105–110.

- SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 1999; 172:63–92.
- SECOMBES CJ. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In: Stolen J, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Van Muiswinkel WB. Techniques in fish immunology. Fair Haven: SOS Publications, p.137-154. 1990.*
- SHARIFUZZAMAN SM e AUSTIN B. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 2009; 27:440–445.
- SILVA EA, SIQUEIRA ACL, PACHECO S, RIBEIRO AK. Hiperplasia adrenal congênita – deficiência de 17-alfa-hidroxilase. *Arq Bras Endocrin Meta* 2000; 44(2):175-177.
- SILVA JRMC, HERNANDEZ-BLAZQUEZ FJ, PORTO-NETO LRI. Comparative study of in vivo and in vitro phagocytosis including germicidal capacity in on *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 8°C. *J Invert Pathol* 2001; 77:180–185.
- SILVA JRMC, STAINES NA, HERNANDEZ-BLAZQUEZ FJ. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage (MØ) of *Notothenia coriiceps*. *J Fish Biol* 2002; 60:466–478.
- SIWICKI AK, ANDERSON DP, DIXON OW. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Dev Comp Immunol* 1990; 14:231-237.
- SUBASINGHE R. Fish health and quarantine. 1997; 886:45-49. *In: A review of the State of the World Aquaculture. FAO, Fisheries circular, Roma, Itália.*
- THOMAS JS. Overview of plasma proteins. *In: Feldman, B.F. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia:Lippincott, p.891-898. 2000.*
- VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:655–671.
- WAKENELL, PS. Hematology of chickens and turkeys. Chapter 122. *In: Schalm's Veterinary Hematology. 6a. Ed., Wiley-Blackwell Publication. 1206p. 2010.*
- ZAR JH. Biostatistical Analysis. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, pp. 576. 2009.
- ZELIKOFF JT, ENANE NA, BOWSER D.. Development of fish peritoneal macrophages as a model for higher vertebrates in immunotoxicological studies. *Fund Appl Tox* 1991; 16:576 – 589.
- ZHOU X, TIAN Z, WANG Y, LI W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiol Bioch* 2009; 36:501-509.

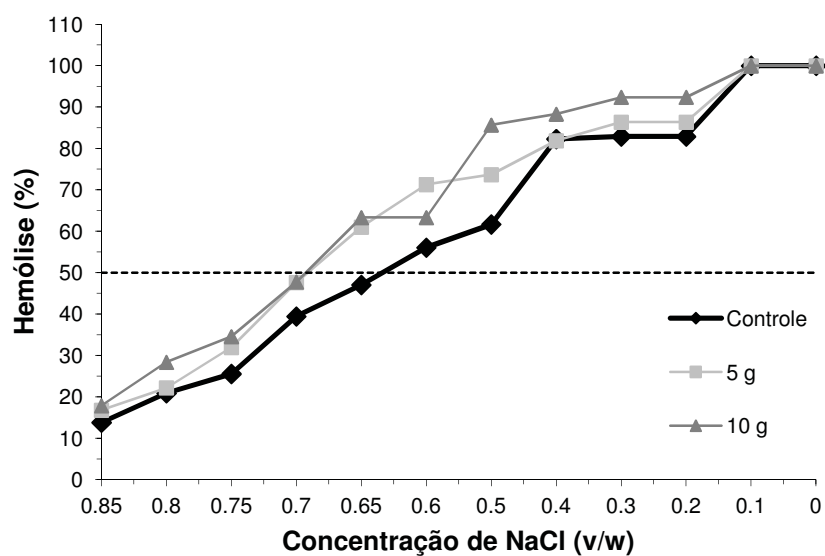


FIGURA 1 – Porcentagem de hemólise de hemácias de juvenil de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, após 3 dias de alimentação com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10 g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

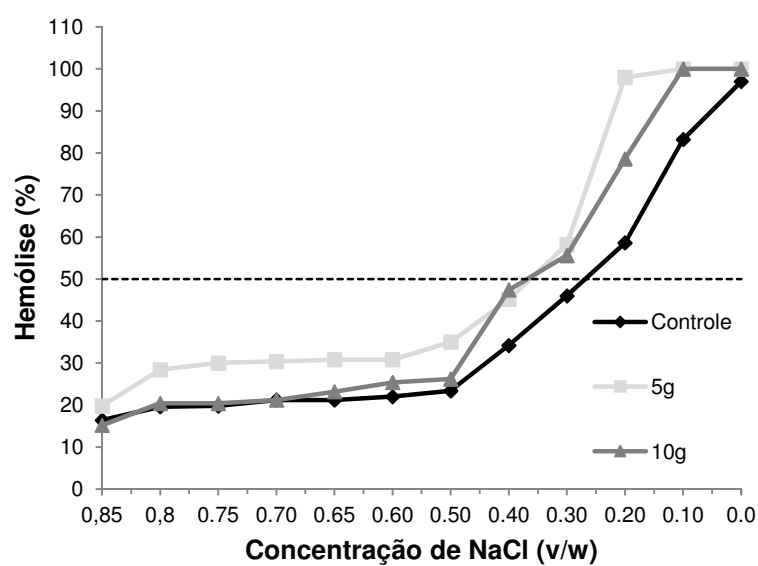


FIGURA 2 – Porcentagem de hemólise de hemácias de juvenil de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, após 7 dias de alimentação com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

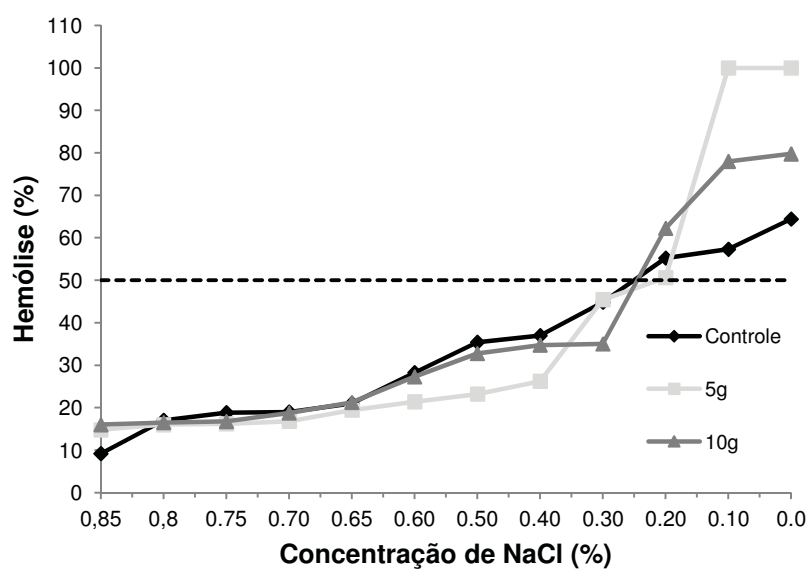


FIGURA 3 – Porcentagem de hemólise de hemácias de juvenil de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, após 14 dias de alimentação com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10 g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

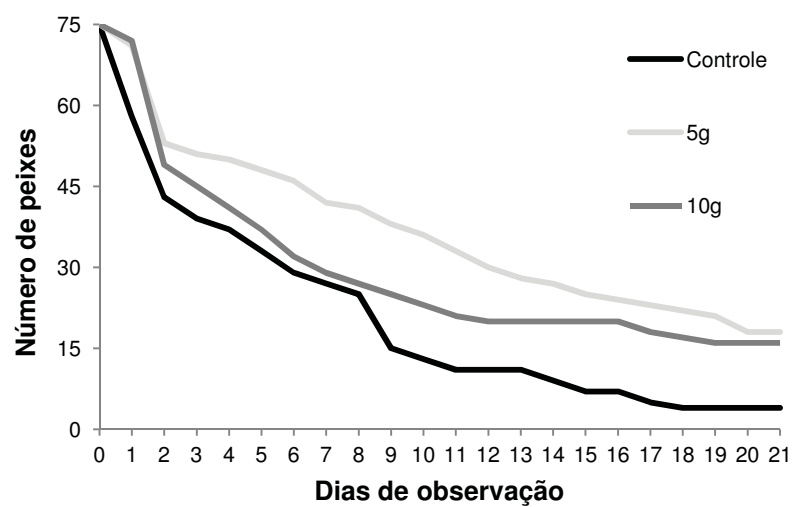


FIGURA 4 – Sobrevivência de juvenil de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1 = 5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* e inoculadas com *Aeromonas hydrophila*.

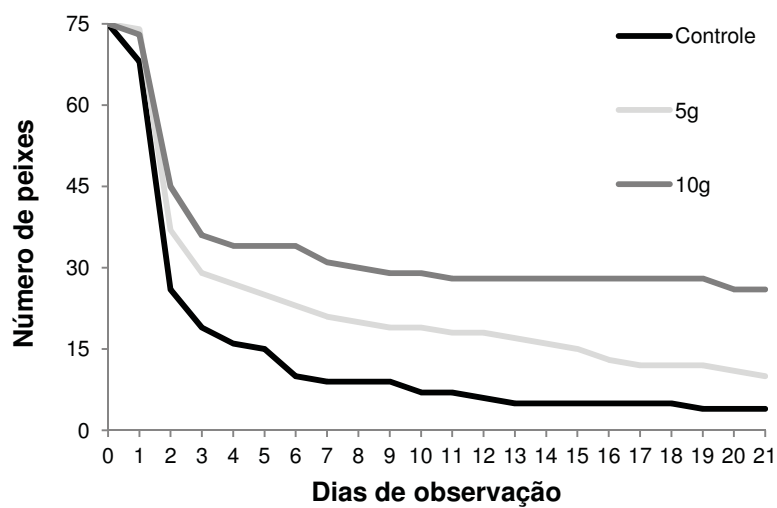


FIGURA 5 – Sobrevivência de juvenil de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, alimentada com dietas suplementadas com níveis de probiótico (controle = 0, T1=5g.kg⁻¹, T2 = 10g.kg⁻¹) contendo *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* e inoculadas com *Streptococcus iniae*.

Conclusões

Conclusões

- A adição do probiótico à alimentação de tilápia do Nilo resultou em maior produtividade e saúde dos animais;
- A inclusão do probiótico através da sua mistura com óleo de soja na ração garante a aderência e colonização dos microorganismos na dieta;
- Os microorganismos probióticos *S. cerevisiae* e *B. subtilis* colonizaram o trato gastro-intestinal de juvenis de tilápia do Nilo, e na dose de 10g por quilograma de ração e o *Aspergillus oryzae* atuou como pré-biótico para os peixes deste experimento;
- A suplementação com a mistura probiótica influencia na quantidade de células de defesa dos peixes, melhorando assim, seu estado de saúde, além de diminuir os efeitos deletérios do estresse de manejo;
- A suplementação probiótica na alimentação visa diminuir as taxas de mortalidade promovidas por infecções causadas por agentes patogênicos.
- Doses de 5 e 10 g de probiótico por quilograma de ração, garantem o aumento nas taxas de sobrevivência de peixes expostos à infecção por *A. hydrophila*;
- A suplementação com 10g de probiótico por quilograma de ração garantem maiores taxas de sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo expostos à infecção *S. iniae*.
- Com base no presente estudo, vê-se a necessidade de novas pesquisas que elucidem de que forma os probióticos interferem no metabolismo e na saúde dos peixes.

Considerações finais

Considerações finais

Na busca pela sustentabilidade e segurança alimentar na aquicultura, o uso de probióticos e outros imunostimulantes na alimentação dos animais de produção visam à diminuição do uso de antibióticos e quimioterápicos. O uso destes nutracêuticos tem como objetivos principais a melhoria da produção e o controle das enfermidades.

Os efeitos benéficos promovidos pela adição dos probióticos estão cada vez mais acessíveis aos produtores e são encontradas informações disponíveis para diversas espécies de peixes. Além disso, uma ampla diversidade de microrganismos considerados como probióticos já são utilizados na aquicultura e ganham espaço e importância na produção de um alimento rico e saudável.

Todavia, nem todos os microrganismos exercem o efeito procurado, e por isso, é vital a continuidade das pesquisas voltadas para a elucidação dos mecanismos de ação dos organismos que possuem características probióticas, suas relações com o hospedeiro e o meio ambiente, além da maneira mais indicada para o seu uso na aquicultura, visando lucratividade e sucesso zootécnico do empreendimento piscícola.

Neste estudo, foi possível observar os diversos efeitos benéficos promovidos pela mistura probiótica de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em tilápia do Nilo. Foi evidenciado que resultados de melhora no desempenho produtivo, aumento nos parâmetros imunes, como o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e migração de macrófagos, e o aumento da taxa de sobrevivência contra doenças infecciosas causadas por duas espécies de bactérias patogênicas, a *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus iniae*.

Estudos de prospecção e análises de viabilidade econômica deverão ser realizados para validar a sua utilização na produção industrial e viabilização do seu acesso aos produtores de peixe. Os resultados deste estudo serviram para aumentar o quadro de evidências sobre os efeitos benéficos dos probióticos na tilapicultura e justificam o aprofundamento nas pesquisas sobre o seu modo de ação e viabilização do seu uso na aquicultura.