

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**“Efeito probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* no desempenho produtivo
e nos parâmetros hematológicos, morfométricos e ultraestruturais do
intestino de tilápias-do-Nilo cultivadas em tanque-rede”**

Thiago Fernandes Alves Silva

JABOTICABAL – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

“Efeito probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* no desempenho produtivo e nos parâmetros hematológicos, morfométricos e ultraestruturais do intestino de tilápias-do-Nilo cultivadas em tanque-rede”

Thiago Fernandes Alves Silva

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engracia de Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp - Caunesp, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

JABOTICABAL – SP

2014

S586e Silva, Thiago Fernandes Alves
Efeito probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* no desempenho produtivo e nos parâmetros hematológicos, morfométricos e ultraestruturais do intestino de tilápias-do-Nilo cultivadas em tanque-rede / Thiago Fernandes Alves Silva. – – Jaboticabal, 2014
viii, 35 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Centro de Aquicultura da Unesp, 2014
Orientadora: Julieta Rodini Engracia de Moraes
Banca examinadora: Lygia Maria Mouri Malvestio; Rogério
Salvador
Bibliografia

1. Aquicultura. 2. Morfologia intestinal. 3. *Oreochromis niloticus* 4.
Morfometria. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da
Unesp/Jaboticabal.

CDU 639.39

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

Agradecimentos

Aos meus pais, por acreditar e me apoiar, independente de qual for minha decisão.

À Nathana, simplesmente por tudo.

À minha orientadora, Dra. Julieta Rodini, pela confiança, apoio e pelo grande exemplo de ética, profissionalismo e respeito.

Aos novos amigos que fiz em Jaboticabal, em especial Daniel, Kike, Robinho, Diego e Nara, Bruno, Thalita, Wilson, Fausto, Silas, Dayanne e Valéria.

Ao amigo Jefferson Yunis, pela grande ajuda durante o mestrado e pelas sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos meus bons e velhos amigos, em especial, Fernando, Carlos, Gelson, Allan, Renata, Thiaglim, Marquim, Greguim, Day, Prii, Gabriel, Walber Jackson, Leice, Henriles, Lucas e até mesmo o Beira Mar (rsr). Eu percebi o quanto vocês são pessoas boas, únicas e incomparáveis.

Aos colegas de laboratório, Marina, Silas, Dayanne, Paulinho, Thalita, Jefferson, Isa, Fausto, Lygia e Wilson, pela ajuda, paciência e ensinamentos. Tenho muito a agradecer a vocês.

Ao Prof. Dalton Carneiro, por ter cedido gentilmente os tanques-rede.

Aos meus amigos e funcionários do Caunesp, Valdecir e Márcio pela ajuda durante o trabalho pesado do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida.

À Fapesp (Processos: 2012/10090-4), pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Unesp (Caunesp), pela oportunidade para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que de algum modo contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho e de forma injusta não foram citados aqui.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* no desempenho produtivo, perfil hematológico, morfometria e ultra-estrutura do intestino de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanque-rede. Foram utilizadas 936 tilápias-do-Nilo, distribuídas em 12 tanques-rede em delineamento inteiramente casualizado constituído por 4 tratamentos e 3 repetições. Os animais foram alimentados por 90 dias (3% biomassa/dia) com as seguintes concentrações de probiótico incluídos à ração comercial: 0 (Controle); 1×10^6 UFC·g⁻¹ (T1); 5×10^6 UFC·g⁻¹ (T2); e 1×10^7 UFC·g⁻¹ (T3). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, ao teste de Tukey (P<0,05). Os resultados demonstraram que não houve diferença no desempenho zootécnico e na composição centesimal. Os níveis de glicose e hemoglobina foram menores nos grupos que receberam as maiores concentrações de probiótico em relação ao grupo controle, indicando que o mesmo induziu a elevação do patamar homeostático. Os demais índices hematológicos não tiveram alterações entre os grupos. Foi observado aumento significativo no tamanho dos vilos e do número de células caliciformes do intestino nos grupos que receberam maior concentração de probiótico o que implica em melhora na digestão e absorção de nutrientes pelos peixes. As microfotografias de varredura do trato gastrointestinal não mostraram presença de *B. amyloliquefaciens* provavelmente pela baixa quantidade de bactérias fornecidas e as condições ambientais adversas do cultivo. Estes resultados permitem inferir que nas condições testadas, a administração de *B. amyloliquefaciens* não apresentou efeito satisfatório quanto ao desempenho zootécnico. Contudo, o aumento das vilosidades intestinais e do número de células caliciformes e elevação do patamar homeostático observados no presente estudo, podem indicar um estado de maior higidez do animal.

Palavras-chave: Aquicultura, morfologia intestinal, *Oreochromis niloticus*, morfometria.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the probiotic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* on productive performance, hematological profile, morphology and ultrastructure of the intestine in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in cages. A total of 936 Nile tilapias were distributed in 12 cages in a completely randomized design consisting of four treatments and three replications. The animals were fed for 90 days (3% biomass / day) with concentrations of probiotic included in commercial diets: 0 (control); 1×10^6 CFU·g⁻¹ (T1); 5×10^6 CFU·g⁻¹ (T2); and 1×10^7 CFU·g⁻¹ (T3). The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and when significant by Tukey's test ($P < 0.05$). There was no difference in growth performance and proximate composition. The glucose level and hemoglobin were lower in the group receiving the highest concentration of probiotic compared to the control group indicating that it may have an effect in increasing the homeostatic level. Others haematological indices presented no differences. There was growth of the villi and the number of goblet cells of the intestine in treated groups, which results in improved digestion and absorption of nutrients by the fish. The scanning photomicrographs of the gastrointestinal tract showed no presence of *B. amyloliquefaciens*. This may be especially the amount of bacteria supplied with the environmental conditions of cultivation. These results allow us to conclude that under the conditions tested, *B. amyloliquefaciens* showed no sufficient effect on growth performance. However, increased intestinal villi, goblet cell number and increased homeostasis level observed in this study could mean a higher state of health in the animal.

Keywords: Aquaculture, intestinal morphology, *Oreochromis niloticus*, morphometry.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. Animais e modelo experimental	4
2.2. Isolamento e identificação da cepa bacteriana probiótica	5
2.3. Preparo da dieta.....	5
2.4. Avaliação do desempenho zootécnico	6
2.5. Avaliação da composição bromatológica	6
2.6. Avaliação do perfil hematológico e glicemia.....	7
2.7. Análise da morfometria intestinal	8
2.8. Microscopia eletrônica de varredura	8
2.9. Análise estatística	9
3. RESULTADOS	10
3.1. Parâmetros físico-químicos da água.....	10
3.2. Desempenho zootécnico.....	11
3.3. Perfil hematológico e glicemia.....	12
3.4. Análise histomorfométrica das vilosidades intestinais.....	14
3.5. Microscopia eletrônica de varredura	17
4. DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO	23
6. REFERÊNCIAS	24

Lista de Figuras

- Figura 1. Temperatura da água de cultivo durante o período experimental 10
- Figura 2. Valores médios de glicemia e hemoglobina no sangue de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração..... 12
- Figura 3. Fotomicrografias da porção anterior do intestino de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração. Em A: Grupo controle; B: T1; C: T2 e D:T3. Aumento proporcional da altura das vilosidades conforme aumento da concentração do probiótico. Barra de escala: 200 μ m. Coloração: Hematoxilina-Eosina. 15
- Figura 4. Fotomicrografias da camada epitelial das vilosidades do intestino de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração. Em A: Grupo controle; B: T1; C: T2 e D:T3. Pontos de cor magenta na borda das vilosidades representam células caliciformes. Aumento gradativo das células caliciformes proporcional à concentração do probiótico na dieta. Barra de escala: 100 μ m. Coloração: Periodic Acid-Schiff..... 16
- Figura 5. Fotomicrografia de varredura da região anterior do intestino de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico. Em A: Controle; B: T1; C: T2 e D: T3. Observar ausência de alterações no grupo controle e nos grupos tratamento (50x, escala: 500 μ m) 17

Lista de Tabelas

Tabela 1. Diferentes concentrações de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> adicionados à dieta basal de tilápias-do-Nilo.	4
Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão da variação dos parâmetros físicos e químicos da água no ambiente de cultivo.	10
Tabela 3. Índices de desempenho zootécnico de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração. GP: Ganho de peso; CAA: Conversão alimentar aparente; TCE: Taxa de crescimento específico; EA: Eficiência alimentar	11
Tabela 4. Valores médios da composição química corporal de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de probiótico na ração. PB: Proteína bruta; EE: Extrato etéreo; UM: Umidade; MM: Matéria mineral; E: Energia.....	11
Tabela 5. Valores médios de Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; RBC: Eritrócitos; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; HCM: Hemoglobina corpuscular média; VCM: Volume corpuscular médio e GP: Glicose plasmática de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de probiótico na ração.....	13
Tabela 6. Valores médios da contagem diferencial da série branca do sangue de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de probiótico na ração.	13
Tabela 7. Parâmetros histomorfométricos do intestino de tilápias-do-Nilo no grupo controle e nos grupos alimentados com diferentes concentrações de probiótico na ração.....	14
Tabela 8. Média e desvio padrão da contagem de células caliciformes na porção anterior do intestino de tilápias-do-Nilo no grupo controle e nos grupos alimentados com diferentes concentrações do probiótico na ração.	14

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de produção animal que mais cresce no mundo (Jensen, Nielsen e Nielsen, 2014). Estima-se que desde 2010 a produção aquícola mundial cresceu em média 6,2% ao ano, chegando a produzir 70,5 milhões de toneladas em 2013 (FAO, 2014).

Dentre as espécies mais cultivadas, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é superada apenas pela carpa (Tsadik e Bart, 2007; Scorvo-Filho et al., 2010). No Brasil, o cultivo de tilápia-do-Nilo apresenta grande importância econômica, devido às suas ótimas características de produção em regiões tropicais como: rápida taxa de crescimento, adaptabilidade a diversos sistemas de criação, rusticidade e boa aceitação de mercado (Tsadik e Bart, 2007; Brasil, 2010).

A falta de disponibilidade de locais para produção de organismos aquáticos é fator limitante para manutenção da atual taxa de crescimento da aquicultura (OECD/FAO, 2013). Como alternativa, o uso de tanques-rede torna-se um meio para o aproveitamento de corpos d'água subutilizados pela piscicultura convencional (Karnatak e Kumar, 2014). Apesar de recente, o cultivo de tilápia-do-Nilo em tanques-rede cresceu ocupando lugar de destaque no Brasil, principalmente pela vasta área hidrográfica disponível, aliada à facilidade do manejo neste sistema e às características biológicas da espécie (Degefu, Mengistu e Schagerl, 2011; Garcia et al., 2014).

Embora vantajoso do ponto de vista produtivo (Kim et al., 2014), o cultivo de peixes em tanques-rede é exercido sobre altas densidades de estocagem, expondo os peixes à elevada condição de estresse, comprometendo o sistema imunológico e fazendo com que se tornem alvos de patógenos como: vírus, bactérias, fungos e parasitas (Akoll et al., 2012; Cerezuela et al., 2012; Telli et al., 2014).

Atualmente, a utilização de antibióticos como medida preventiva de doenças é bastante questionada por ser fonte de poluição ambiental (Ayandiran et al., 2014), acumular-se na carne dos peixes (Lim e Webster, 2006) e principalmente por promover a resistência de bactérias à estes fármacos (Wood,

Gold e Moelling-Jr, 1996; Balcázar et al., 2006), representando sério risco para a saúde humana e animal (Kersarcodi-Watson et al., 2008).

Um método alternativo e promissor para o controle de doenças em peixes é o uso de microrganismos vivos que podem restringir o crescimento de patógenos (Aly et al., 2008). Estes microrganismos que quando administrados de forma adequada conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro são chamados de probióticos (FAO/WHO, 2001).

Além de representar uma medida ao combate de doenças, os probióticos são utilizados como promotores de sínteses vitamínicas (Lin et al., 2012; Lee et al., 2013), melhorando o desempenho zootécnico de animais (Mohapatra et al., 2014; Reyes-Becerril et al., 2014), elevando o percentual de sobrevivência (Xing et al., 2013; Wu et al., 2014) e a qualidade de água (Talpur et al., 2013; Chi et al., 2014a).

A eficiência dos probióticos em peixes pode ser avaliada utilizando-se vários parâmetros como: a capacidade de se estabelecer e multiplicar no trato gastrointestinal do hospedeiro (Chi et al., 2014b; Lazado e Caipang, 2014), apresentar propriedades antagonistas para um ou mais patógenos (Balcázar, et al., 2006), ser livre de genes de resistência a antibióticos e não deve ser patogênico à espécie hospedeira e a outros organismos (Merrifield et al., 2010). Além disso, é importante que as bactérias probióticas apresentem contribuições nutricionais (Ringo e Gatesoupe, 1998) e promovam crescimento e bem-estar do animal (Avella et al., 2010; Merrifield et al., 2010).

Os meios exatos pelos quais os probióticos melhoram o desempenho produtivo não são bem conhecidos (Sun et al., 2010). Sabe-se que os mesmos estimulam o desenvolvimento da superfície de absorção de nutrientes pela modificação na estrutura intestinal, aumentam os nutrientes disponíveis para absorção e a quantidade de enzimas digestivas no trato gastrointestinal (Mello et al., 2013). Além disso, as bactérias probióticas podem ser utilizadas como fonte de nutrientes (Ten Doeschate e Coyne, 2008).

As bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se entre os principais probióticos utilizados na aquicultura. Estas bactérias apresentam facilidade de cultivo e formação de esporos resistentes a efeitos físicos e químicos, o que facilita sua conservação (Wang et al., 2008; Nayak, 2010a; Das et al., 2013; Han et al.,

2015). Além disso, várias bactérias deste gênero apresentam capacidade de segregar compostos antimicrobianos e diferentes exoenzimas que auxiliam na digestão (Nicholson et al., 2000; Rengpipat et al., 2000; Ziaei-Nejad et al., 2006).

Bacillus amyloliquefaciens (Fukamoto, 1943) é uma bactéria não patogênica em forma de bastonete, aeróbica, Gram-positiva e catalase positiva (Loncar et al., 2014). Sua forma é semelhante ao *Bacillus subtilis*, porém fermenta lactose e pode crescer em meio contendo NaCl (10%) (Welker e Campbell, 1967). *B. amyloliquefaciens* apresenta grande resistência à variação nas condições ambientais (Mahdhi et al., 2012; Das et al., 2013), atividade antibacteriana de largo espectro (Kaewklom et al., 2013) e é uma importante produtora de α -amilase, enzima que atua na digestão de carboidratos (Wang et al., 2008).

Destacam-se na literatura, os seguintes estudos do uso probiótico do *B. amyloliquefaciens* na aquicultura: Cao et al., (2011) observaram em *Anguilla anguilla* atividade antagonista de *B. amyloliquefaciens* frente a *Aeromonas hydrophila*. O mesmo efeito foi observado por Ran et al., (2012) em *Ictalurus punctatus*, para *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella ictaluri*. Ridha e Azad, (2012) relatam em *O. niloticus* melhorias no desempenho produtivo e na resposta imune, Reda e Selim, (2014) também em *O. niloticus*, observaram alterações positivas na composição corporal e morfologia intestinal e Das et al., (2013) observaram aumento na resistência às doenças em *Catla catla*.

Como sua utilização como probiótico é recente, pouco se conhece sobre seu efeito no organismo hospedeiro. Neste sentido, mais estudos são necessários para definir o efeito desta bactéria no crescimento dos peixes e no trato intestinal (Das et al., 2013). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito probiótico da inclusão de três concentrações de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o desempenho produtivo, perfil hematológico, morfometria e ultra-estrutura intestinal em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanque-rede.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e modelo experimental

O experimento foi realizado no lago do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (21°. 14.33' S, 48°.17.55' O). Foi instalado um sistema de tanques-rede composto por 12 tanques (1,5m³). Em cada tanque, foram utilizadas 78 tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (35±5g) masculinizadas e provenientes da mesma desova. Os tanques-rede foram distribuídos em 4 grupos experimentais em triplicata em delineamento inteiramente casualizado.

Os animais foram aclimatados durante 10 dias e alimentados com ração comercial (NutriAcqua® 28%PB, 3600 kcal.kg⁻¹). A inclusão do probiótico seguiu a distribuição apresentada na tabela 1.

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

Tratamento	Inclusão de <i>B. amyloliquefaciens</i>
Controle	0
T1	1×10^6 UFC·g ⁻¹
T2	5×10^6 UFC·g ⁻¹
T3	1×10^7 UFC·g ⁻¹

A taxa de alimentação foi de 3% do peso vivo fornecida 3 vezes ao dia por 90 dias. Neste período foram realizadas duas biometrias aos 30 e 60 dias para ajuste da quantidade da dieta fornecida. Diariamente a temperatura da água e o oxigênio dissolvido foram mensurados com aparelho YSI 53 (YSI Company, USA). O pH e a condutividade elétrica foram mensuradas semanalmente com auxílio do aparelho YSI 63 (YSI Company, USA). A transparência da água foi mensurada utilizando o disco de Secchi, no horário de 11:00 horas, em dias alternados e com incidência de poucas nuvens.

2.2. Isolamento e identificação da cepa bacteriana probiótica

O probiótico utilizado é derivado de um produto comercial que contém em sua composição *Bacillus amyloliquefaciens*. Para confirmação da presença desta bactéria no produto, 1,0 g do probiótico liofilizado foi homogeneizando em 99 mL de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4). Desta solução, 1 mL foi transferido para recipiente contendo solução peptonada (4%) (Sigma-Aldrich, MO, USA) para realizações das diluições séricas. De cada diluição, 100 µl da solução foram distribuídos em placas de petri contendo meio de cultura “Trypticase Soy Agar” (TSA). Cada placa foi montada em *Spread plate* em triplicata e incubadas por 24 a 48h em aerobiose a 26°C. As colônias de *Bacillus* sp. foram identificadas observando suas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais (Priest et al., 1987). A partir das colônias isoladas foi realizado o sequenciamento do gene 16S rDNA pelo método proposto por Sanger, Niklen e Coulson (1977).

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

2.3. Preparo da dieta

Foi utilizado o probiótico liofilizado contendo *B. amyloquifaciens*, adicionado à ração comercial (NutriAcqua 28%PB, 3600 kcal.kg⁻¹) nas concentrações anteriormente descritas. Para conseguir concentrações finais homogêneas de bactérias na dieta e facilitar a adesão do probiótico à ração, a suspensão bacteriana foi adicionada à ração e homogeneizada manualmente com adição de óleo vegetal comercial (4% do peso; 4000 kcal.L⁻¹). Assim, segundo as

recomendações de Das et al., (2013), o alimento foi preparado a cada 7 dias para manter o nível ideal de probiótico na ração.

2.4. Avaliação do desempenho zootécnico

Após 90 dias de alimentação com dieta suplementada com probiótico, os grupos experimentais foram transferidos para o centro de Pesquisa em Patologia e Parasitologia Animal (CPPar) e acondicionados em caixas de fibra de 250L (n=16) abastecidas com água corrente de poço artesiano com vazão constante e aeração suplementar.

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

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

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

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

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

2.5. Avaliação da composição bromatológica

Após o período de alimentação com ração suplementada com probiótico, 10 peixes de cada um dos grupos foram submetidos a eutanásia com o uso de benzocaína diluída (0,5 g.L⁻¹) (Wedemeyer, 1970) e estocados em freezer a -18°C para posterior análise da composição química corporal. As amostras ainda congeladas foram moídas individualmente em moedor de carne, até obter uma polpa homogênea. Esta polpa foi posteriormente seca em estufa a 55°C por 48 horas e moídas em moinho bola. A umidade foi então determinada através de secagem em estufa a 105° C durante 24 horas. O teor de cinzas foi obtido através da incineração em mufla a 550°C e a energia definida por meio de

bomba calorimétrica. A proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl e o extrato etéreo pelo método Soxhlet (AOAC, 2000).

2.6. Avaliação do perfil hematológico e glicemia

Após o término do período de alimentação, 10 animais de cada grupo foram estocados em caixas de água por 3 dias e posteriormente anestesiados com benzocaína diluída (0,1g.L⁻¹). O sangue foi coletado por punção do vaso caudal com seringa descartável e distribuído em microtubos contendo EDTA (10%).

Foi determinado o hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), hemoglobina (Collier, 1944) e contagem de eritrócitos (Campbell e Mader, 2006) utilizando a solução de Natt & Herrick como diluente e corante (Natt e Herrick, 1952).

Com estas variáveis foram calculados o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo as expressões:

$$VCM = \frac{\text{hematócrito}(\%)}{\text{RBC (milhões / mm}^3\text{)}} \times 10$$

$$HCM = \frac{\text{Hb total (g\%)}}{\text{RBC (milhões / mm}^3\text{)}} \times 10$$

$$CHCM(\%) = \frac{\text{Hb total (g\%)}}{\text{Htc(\%)}} \times 100$$

Para contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos, as extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas com corante Panótico Rápido (Laborclin; PR. Brasil). As contagens de leucócitos e trombócitos foram realizadas em extensões sanguíneas considerando até 2000 eritrócitos para a contagem total. De posse desses resultados e da contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer, foi realizado o cálculo:

$\text{Leucócitos } (\mu\text{L de sangue}) = (\text{número de leucócitos} \times \text{contagem de eritrócitos}/\mu\text{L}) / \text{número eritrócitos na extensão sanguínea}$

$\text{Trombócitos } (\mu\text{L de sangue}) = (\text{número trombócitos} \times \text{contagem de eritrócitos}/\mu\text{L}) / \text{número eritrócitos na extensão sanguínea}$

A determinação da glicemia foi realizada com uma alíquota de sangue e avaliada no analisador rápido para glicose One Touch UltraMini® (Lifescan, CA, USA).

2.7. Análise da morfometria intestinal

A coleta do intestino foi realizada nos mesmos peixes submetidos à análise do perfil hematológico. Os peixes foram submetidos a eutanásia conforme descrito anteriormente e realizada uma incisão longitudinal no ventre para exposição dos órgãos. O segmento do intestino coletado correspondeu à porção anterior localizada dois centímetros a partir do piloro.

Cada fragmento do intestino foi fixado em solução de Bouin por 24 horas. A desidratação posterior foi feita em álcool 70% até o momento do processamento histológico de rotina (Honorato et al., 2011). Os fragmentos foram divididos e separados em lâminas diferentes e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise da morfologia das vilosidades e com “Periodic Acid Schiff” (PAS) para a contagem de células caliciformes.

As lâminas foram analisadas no microscópio de luz com o auxílio do analisador de imagem AxioVision Zeiss®. Foi realizada a mensuração da altura da vilosidade desde a base do vilo até o ápice, altura total da vilosidade desde a serosa até o ápice do vilo, largura da vilosidade, espessura do epitélio e contagem das células caliciformes. As mensurações foram realizadas em dez vilosidades de cada corte do intestino em objetivas de 5x e 10x.

2.8. Microscopia eletrônica de varredura

Para análise de microscopia eletrônica do trato intestinal foram utilizados três peixes por grupo. Um fragmento da porção anterior do intestino de cada animal foi coletado e acondicionado em frasco contendo glutaraldeído (3%). Após 24 horas de fixação, cada fragmento do intestino foi preso nas extremidades a um papel cartão e aberto no sentido longitudinal com auxílio de um bisturi, expondo as vilosidades. Posteriormente, o fragmento foi lavado com tampão fosfato (0,1 M; pH 7,6) e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (1%). As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (30 a 100%) e o material levado ao secador de ponto crítico com dióxido de carbono. O material foi recoberto com uma camada de 30nm de ouro e finalmente, eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura (Modelo Jeol JSM 5410) operando em 15 KV.

2.9. Análise estatística

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

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros físico-químicos da água

O experimento foi realizado entre os meses de Abril a Junho de 2014. Durante o período experimental, com exceção da temperatura, não foram observadas alterações na qualidade da água que possam ter interferido na alimentação das tilápias-do-Nilo (Boyd e Massaut, 1990). Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água mensurados nos meses do experimento estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão da variação dos parâmetros físicos e químicos da água no ambiente de cultivo.

Parâmetros da água	Média
Temperatura (°C)	24,35 $\pm$ 2,43
Oxigênio (mg/L)	7,31 $\pm$ 0,48
pH	7,50 $\pm$ 0,30
Transparência (cm)	26,03 $\pm$ 2,10
Condutividade (μ V)	45,54 $\pm$ 10,40

A temperatura da água variou de 21,9°C a 27,1°C, reduzindo gradativamente do início ao fim do experimento (Figura 1). Os demais índices se mantiveram praticamente constantes durante este período.

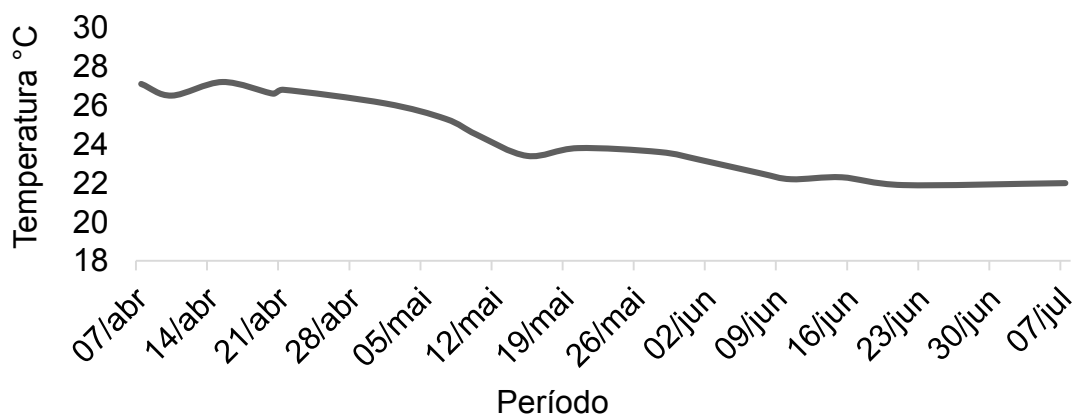


Figura 1. Temperatura da água de cultivo durante o período experimental

3.2. Desempenho zootécnico

Não houve diferença estatística entre o efeito das diferentes concentrações do probiótico e os índices zootécnicos avaliados. Portanto, nas condições avaliadas, o *B. amyloliquefaciens* não apresentou eficácia no ganho de peso, na conversão alimentar aparente, na taxa de crescimento específico e na eficiência alimentar para tilápia-do-Nilo (Tabela 3). Os valores da análise bromatológica da composição corporal dos peixes também não mostraram diferença significativa entre os grupos tratamento e controle (Tabela 4).

Tabela 3. Índices de desempenho zootécnico de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração. GP: Ganho de peso; CAA: Conversão alimentar aparente; TCE: Taxa de crescimento específico; EA: Eficiência alimentar

Tratamentos	GP (g)	CAA (g)	TCE (%)	EA
Controle	86,84 ± 36,53 ^a	1,80 ± 0,52 ^a	1,10 ± 0,51 ^a	0,842 ± 0,245 ^a
T1	83,47 ± 30,84 ^a	1,79 ± 0,50 ^a	1,09 ± 0,44 ^a	0,864 ± 0,245 ^a
T2	90,44 ± 39,68 ^a	1,95 ± 0,82 ^a	1,13 ± 0,53 ^a	0,791 ± 0,300 ^a
T3	94,5 ± 39,66 ^a	1,57 ± 0,41 ^a	1,18 ± 0,55 ^a	0,906 ± 0,206 ^a

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos para as variáveis apresentadas.

Tabela 4. Valores médios da composição química corporal de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de probiótico na ração. PB: Proteína bruta; EE: Extrato etéreo; UM: Umidade; MM: Matéria mineral; E: Energia.

Tratamentos	PB%	EE %	UM %	MM %	E (Kcal/kg)
Controle	43,1 ± 0,3 ^a	25,8 ± 0,8 ^a	22,5 ± 0,5 ^a	11,8 ± 0,7 ^a	5064 ± 21,1 ^a
T1	44,6 ± 0,4 ^a	24,2 ± 0,9 ^a	23,8 ± 0,3 ^a	13,8 ± 0,4 ^a	5716 ± 13,5 ^a
T2	39,9 ± 0,6 ^a	25,4 ± 0,7 ^a	23,2 ± 0,6 ^a	12,3 ± 0,4 ^a	5150 ± 16,1 ^a
T3	42,8 ± 0,4 ^a	26,6 ± 0,8 ^a	22,7 ± 0,5 ^a	12,0 ± 0,6 ^a	5635 ± 18,3 ^a

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos para as variáveis apresentadas.

3.3. Perfil hematológico e glicemia

Os valores de hemoglobina e glicemia apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. O grupo que recebeu maior concentração do probiótico na ração (T3) apresentou menor valor para estas variáveis em relação ao grupo controle (Figura 2). Os demais índices hematimétricos da série vermelha (Tabela 5) e a contagem diferencial de leucócitos (Tabela 6) não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

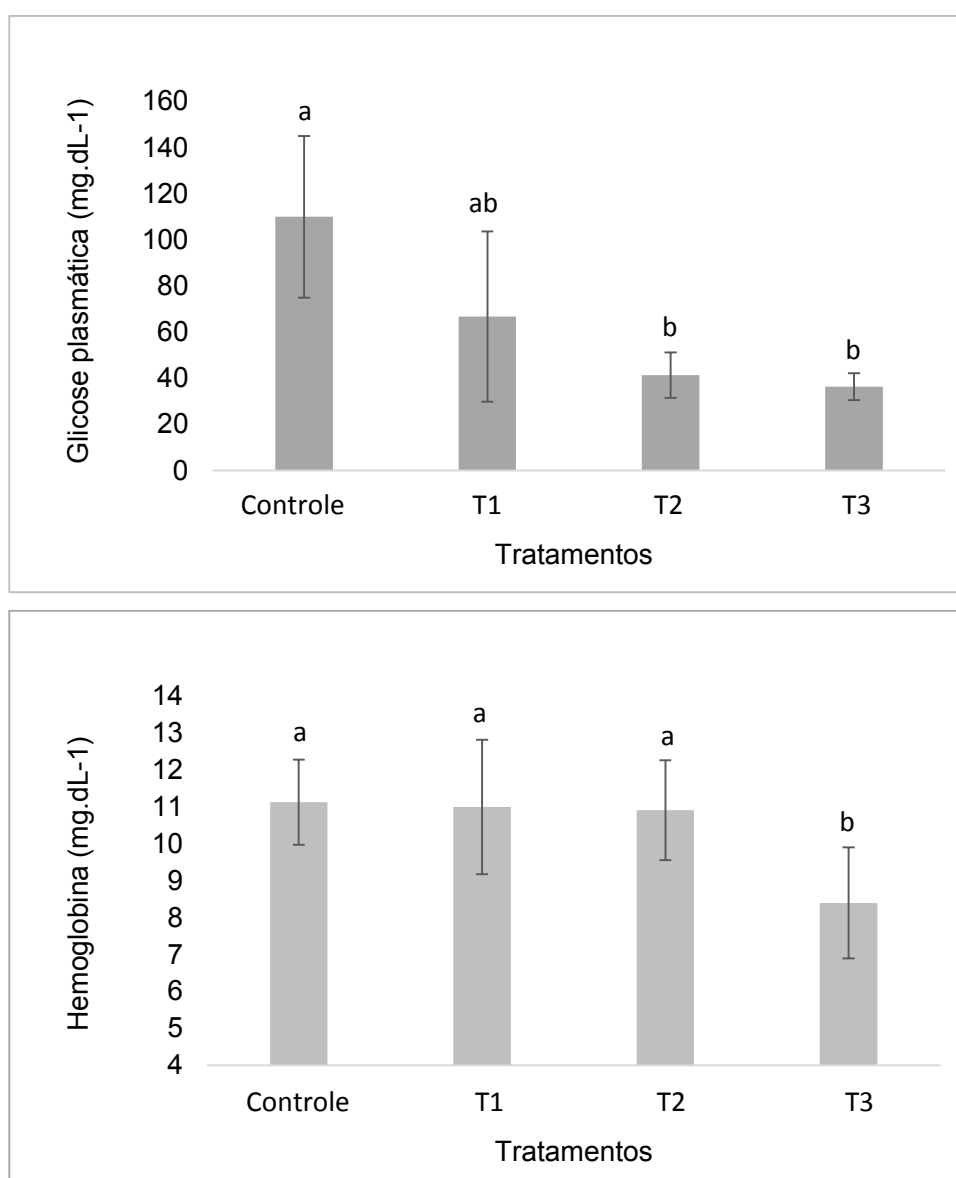


Figura 2. Valores médios de glicemia e hemoglobina no sangue de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração.

Tabela 5. Valores médios de Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; RBC: Eritrócitos; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; HCM: Hemoglobina corpuscular média; VCM: Volume corpuscular médio e GP: Glicose plasmática de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de probiótico na ração.

Tratamento	Hct (%)	Hb (g.dL ⁻¹)*	RBC (x 10 ⁴ µL ⁻¹)	CHCM (g.dL ⁻¹)	HCM (pg)	VCM (fL)	GP* (mg dL ⁻¹)
Controle	36,8 ± 2,9 ^a	10,75 ± 1,0 ^a	295,93 ± 49,6 ^a	27,01 ± 3,4 ^a	33,05 ± 5,8 ^a	125,96 ± 21,7 ^a	110,00 ± 34,9 ^a
T1	38,5 ± 3,4 ^a	11,20 ± 1,6 ^a	292,33 ± 34,6 ^a	24,44 ± 3,2 ^a	32,53 ± 4,6 ^a	123,78 ± 11,0 ^a	66,80 ± 36,8 ^{ab}
T2	39,2 ± 1,6 ^a	10,90 ± 1,3 ^a	303,06 ± 33,4 ^a	27,95 ± 4,9 ^a	35,72 ± 7,0 ^a	127,89 ± 11,8 ^a	41,40 ± 9,8 ^b
T3	37,4 ± 1,9 ^a	8,53 ± 1,2 ^b	293,50 ± 36,5 ^a	26,36 ± 4,6 ^a	35,08 ± 7,9 ^a	133,31 ± 20,4 ^a	36,25 ± 5,8 ^b

Média seguida por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 6. Valores médios da contagem diferencial da série branca do sangue de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações de probiótico na ração.

Tratamento.	Leucócitos (mm ³)	Linfócitos (10 ³ . µL ⁻¹)	Neutrófilos (10 ³ . µL ⁻¹)	Monócitos (10 ³ . µL ⁻¹)	Basófilos (10 ³ . µL ⁻¹)	Eosinófilos (10 ³ . µL ⁻¹)
C	110,2 ± 20,5 ^a	31,44 ± 8,1 ^a	16,3 ± 4,92 ^a	16,02 ± 3,4 ^a	0 ± 0	0,3 ± 0,04 ^a
T1	129,4 ± 27,8 ^a	26,31 ± 13 ^a	19,55 ± 5,21 ^a	15,03 ± 4,7 ^a	0 ± 0	0,31 ± 0,2 ^a
T2	105,92 ± 14,3 ^a	30,72 ± 9,3 ^a	16,2 ± 4,16 ^a	17,46 ± 6,2 ^a	0 ± 0	0,27 ± 0,18 ^a
T3	112 ± 13,4 ^a	28,11 ± 6,4 ^a	14,11 ± 3,1 ^a	14,6 ± 7,2 ^a	0 ± 0	0,32 ± 0,23 ^a

Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos para as variáveis apresentadas

3.4. Análise histomorfométrica das vilosidades intestinais

A análise histomorfométrica da porção anterior do intestino mostrou diferença significativa na altura dos vilos nos grupos T2 e T3 em relação ao grupo T1 e controle (Figura 3). Contudo, não foram observadas lesões no tecido intestinal e nem diferenças no aumento e na altura total, largura dos vilos e espessura do epitélio entre os grupos tratamentos e o controle (Tabela 7). Os peixes que receberam maior concentração do probiótico também apresentaram número significativamente maior de células caliciformes que o grupo controle (Tabela 8; Figura 4).

Tabela 7. Parâmetros histomorfométricos do intestino de tilápias-do-Nilo no grupo controle e nos grupos alimentados com diferentes concentrações de probiótico na ração.

Tratamentos	Altura Total dos Vilos (μm)	Altura dos Vilos (μm)	Largura dos Vilos (μm)	Espessura do Epitélio (μm)
Controle	466,0 $\pm$ 92,9 ^a	378,1 $\pm$ 99,7 ^b	62,5 $\pm$ 27,7 ^a	113,3 $\pm$ 83,4 ^a
T1	407,2 $\pm$ 121,1 ^a	371,3 $\pm$ 91,6 ^b	51,4 $\pm$ 8,7 ^a	98,9 $\pm$ 19,8 ^a
T2	438,4 $\pm$ 105,5 ^a	423,2 $\pm$ 95,3 ^a	54,2 $\pm$ 11,4 ^a	118,3 $\pm$ 21,5 ^a
T3	487,2 $\pm$ 31,2 ^a	469,4 $\pm$ 25,1 ^a	57,0 $\pm$ 13,3 ^a	107,3 $\pm$ 23,9 ^a

Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Tabela 8. Média e desvio padrão da contagem de células caliciformes na porção anterior do intestino de tilápias-do-Nilo no grupo controle e nos grupos alimentados com diferentes concentrações do probiótico na ração.

Tratamento	Células Caliciformes por vilos
Controle	11,38 $\pm$ 5,2 ^b
T1	16,45 $\pm$ 6,63 ^{ab}
T2	25,24 $\pm$ 8,32 ^a
T3	23,32 $\pm$ 8,43 ^a

Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

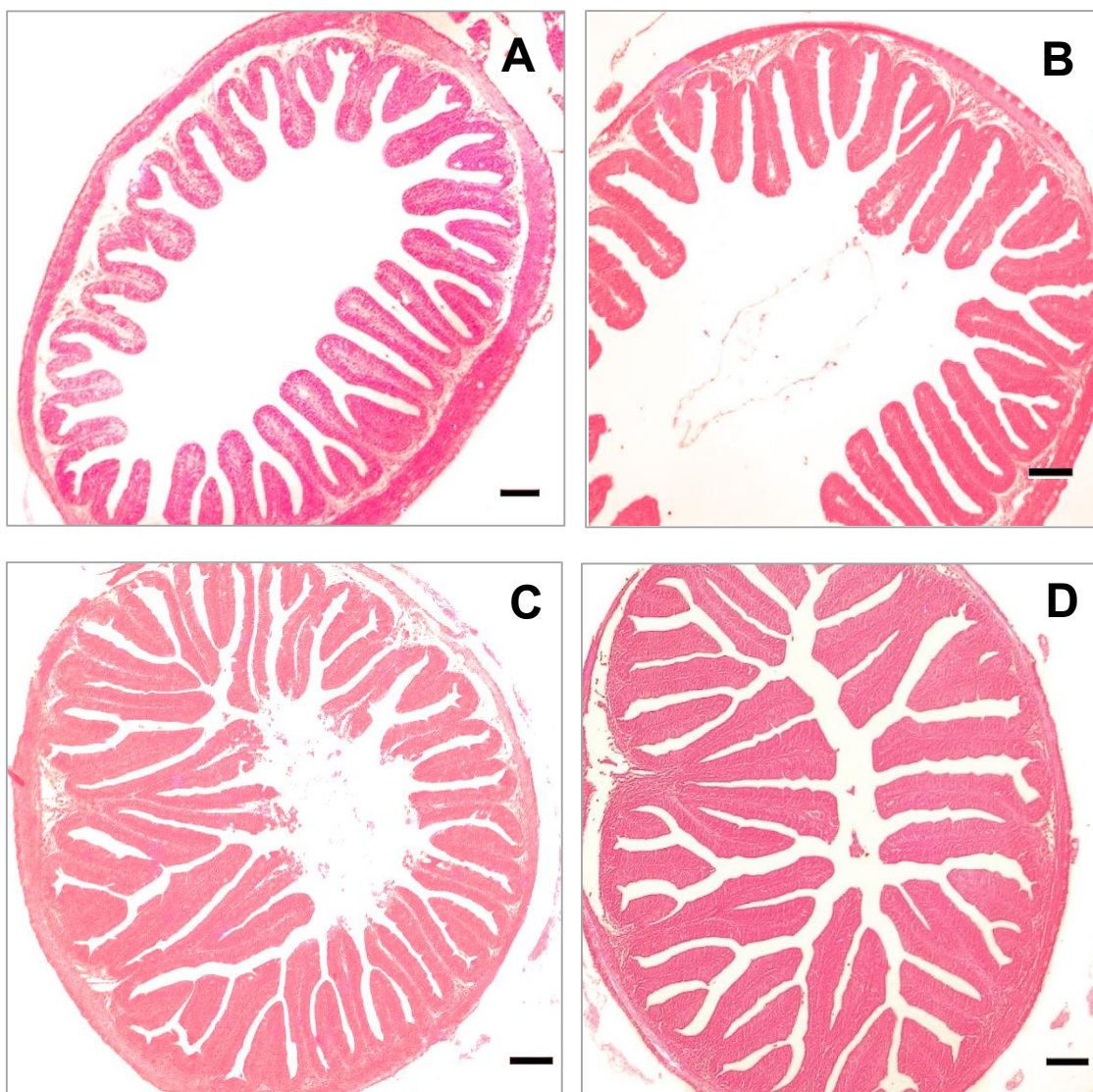


Figura 3. Fotomicrografias da porção anterior do intestino de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração. Em A: Grupo controle; B: T1; C: T2 e D: T3. Aumento proporcional da altura das vilosidades conforme aumento da concentração do probiótico. Barra de escala: 200 μ m. Coloração: Hematoxilina-Eosina.

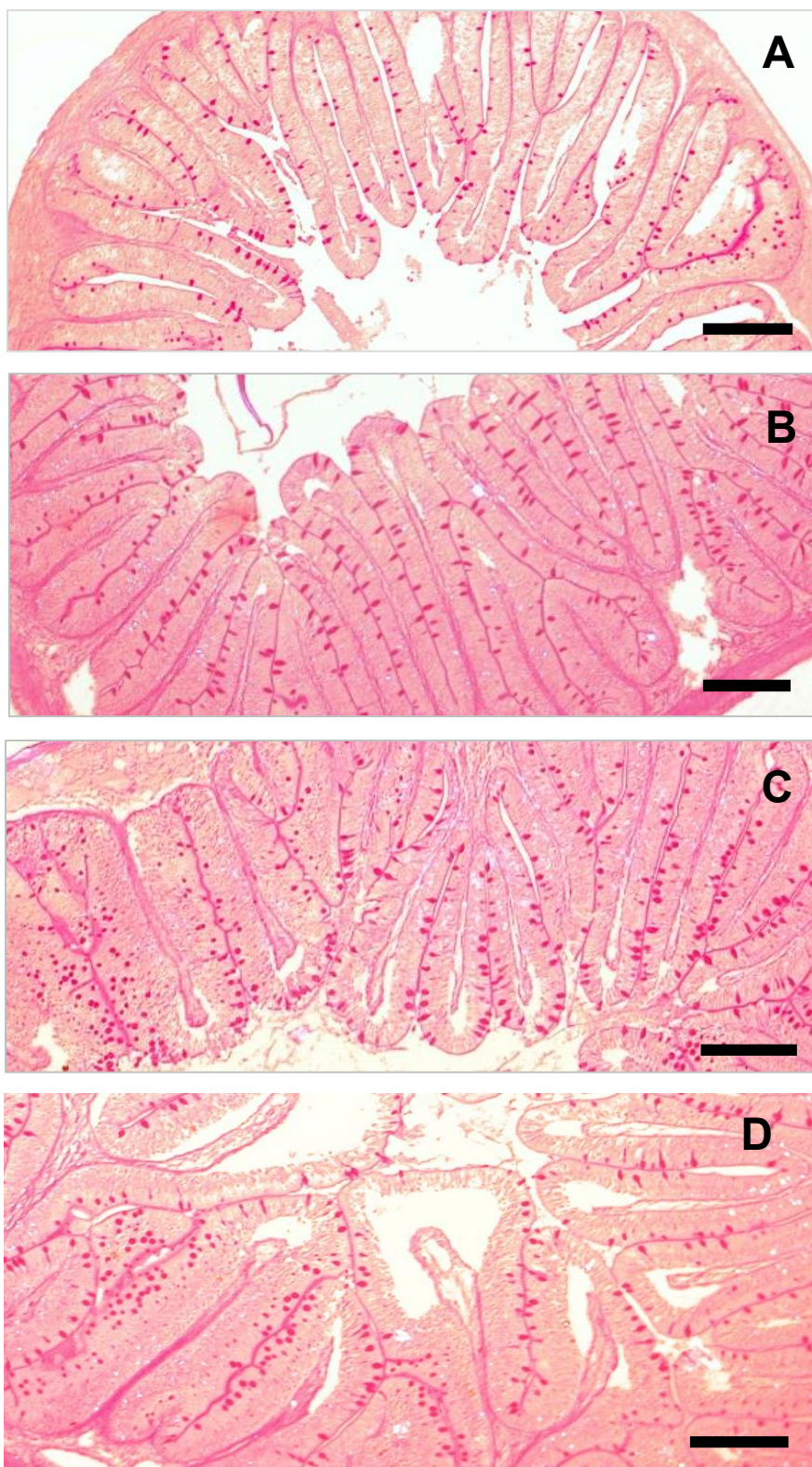


Figura 4. Fotomicrografias da camada epitelial das vilosidades do intestino de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico na ração. Em A: Grupo controle; B: T1; C: T2 e D: T3. Pontos de cor magenta na borda das vilosidades representam células caliciformes. Aumento gradativo das células caliciformes proporcional à concentração do probiótico na dieta. Barra de escala: 100 μm. Coloração: Periodic Acid-Schiff

3.5. Microscopia eletrônica de varredura

Não foram observadas diferenças na morfologia e colonização do intestino nos grupos avaliados. As fotomicrografias de varredura mostraram escassas populações de bactérias em forma de cocos aderidas à superfície intestinal, provavelmente autóctones. Nenhuma bactéria probiótica, em forma de bacilo, foi encontrada na análise das microfotografias (Figura 5).

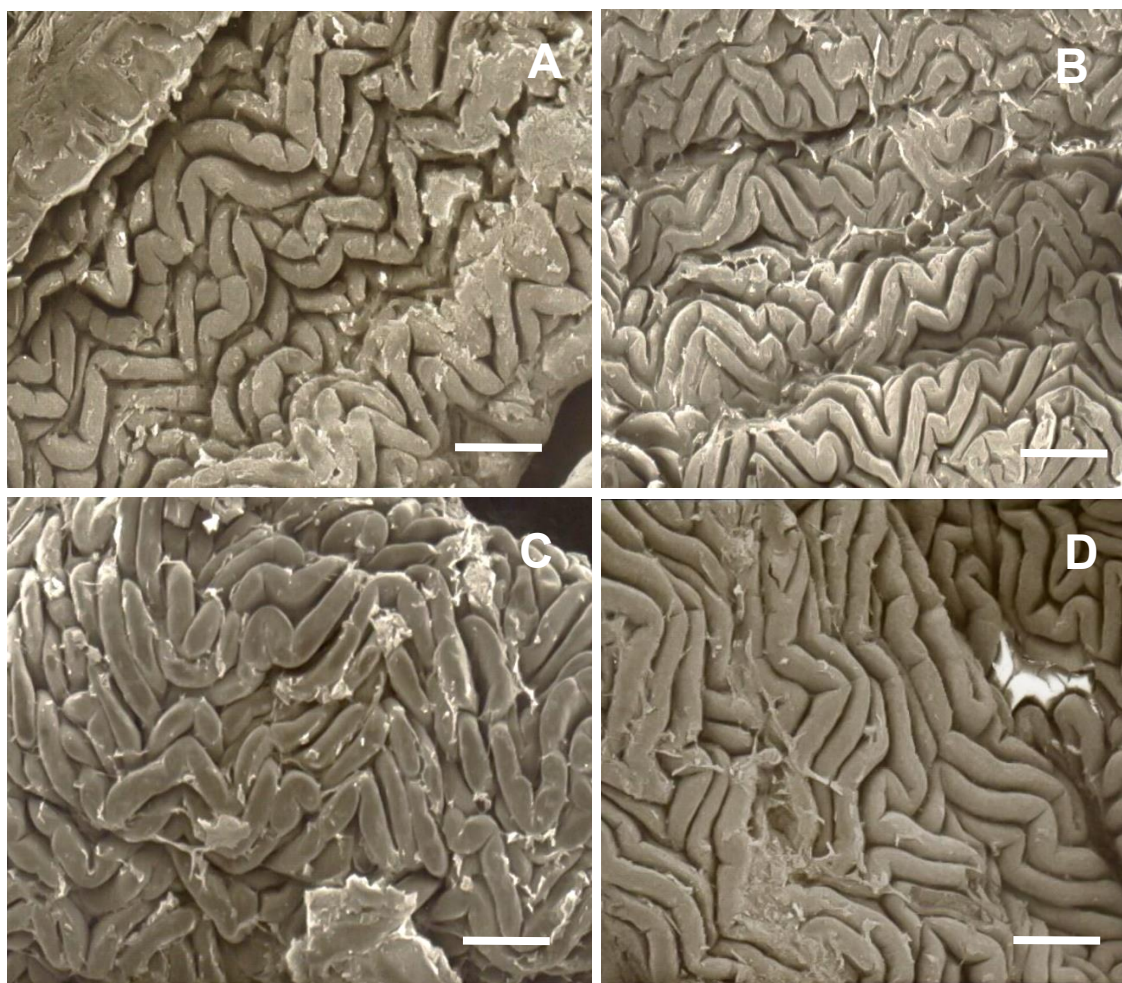


Figura 5. Fotomicrografia de varredura da região anterior do intestino de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes concentrações do probiótico. Em A: Controle; B: T1; C: T2 e D: T3. Observar ausência de alterações no grupo controle e nos grupos tratamento (50x, escala: 500µm)

4. DISCUSSÃO

Na aquicultura, o fornecimento da dieta ideal está relacionado ao crescimento dos animais e pode implicar na redução de custos de produção (Lovell, 1991). Neste sentido, as bactérias do gênero *Bacillus* são comumente avaliadas quanto ao seu efeito probiótico na melhoria do desempenho zootécnico em várias espécies de peixes (Apun-Molina et al., 2009; Wu et al., 2012).

Sun et al., (2010) observaram melhoria na taxa de conversão alimentar de *Epinephelus coioides* após 60 dias de suplementação com *Bacillus clausii* e *Bacillus pumilus* (10^8 UFC g^{-1}). He et al., (2011) também relataram melhorias no desempenho em *Cyprinus carpio* alimentados com *B. subtilis* (10^{10} CFU g^{-1}) após 5 semanas de suplementação.

Para tilápias-do-Nilo, os benefícios do gênero *Bacillus* no desempenho zootécnico foram relatados por Reda e Selin (2014) que observaram aumento no ganho de peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar ao fornecer *B. amyloliquefaciens* (10^6 UFC. g^{-1}) para alevinos por 60 dias. Entretanto, os autores não observaram diferenças quando o probiótico foi administrado na concentração 10^4 UFC g^{-1} . Da mesma forma, Telli et al., (2014) não observaram efeito de *B. subtilis* (5×10^6 CFU g^{-1}) sobre o desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo, mesmo após 84 dias de suplementação da dieta.

No presente estudo, não foi observado efeito probiótico do *B. amyloliquefaciens* sobre os índices zootécnicos avaliados. Ridha e Azad (2012) forneceram *B. amyloliquefaciens* (10^8 UFC g^{-1}) para tilápias-do-Nilo por 99 dias e também não encontraram neste período diferença nos índices de desempenho em relação aos grupos tratamento e controle. Entretanto, eles observaram que ao continuar o fornecimento da dieta por mais 60 dias sem adição do probiótico os animais suplementados com *B. amyloliquefaciens* apresentaram melhor desempenho produtivo, sugerindo que os efeitos deste probiótico manifestam-se em longo prazo no desempenho produtivo.

Sun et al., (2010) observaram que o fornecimento de altas concentrações de *Bacillus* sp. (10^8 UFC g^{-1}) em *Epinephelus coioides* melhorou

o desempenho produtivo. Neste trabalho, foram utilizadas concentrações menores que estas, não apresentando os mesmos resultados, sugerindo que para haver melhoria no desempenho zootécnico de tilápias-do-Nilo é necessária a utilização de maior concentração do probiótico.

A eficiência de transferência de nutrientes da dieta para o organismo pode ser determinada pelo conhecimento da composição centesimal (Shearer, 1994). Esta análise é de grande importância, uma vez que pode refletir o valor nutricional do animal e suas características organolépticas (Contreras-Guzmán, 1994).

Diversos autores relatam melhorias na composição corporal de tilápias-do-Nilo quando sujeitas às dietas suplementadas com probióticos (Abd El-Rhman et al., 2009; Mello et al., 2013; Hassaan, Soltan e Ghonemy, 2014; Reda e Selin, 2014). Entretanto, neste estudo, os valores da análise da composição corporal não mostraram diferença significativa entre os grupos tratamento e controle, corroborando os resultados de Telli et al., (2013) suplementando a dieta de tilápias-do-Nilo com *B. subtilis*.

Os parâmetros hematológicos dos peixes são usados como indicadores do seu estado fisiológico (Mohapatra et al., 2014). É reportado em vários estudos que o fornecimento de *Bacillus* sp., pode causar alterações (Hassaan, Soltan e Ghonemy, 2014; Telli et al., 2014) ou não (kumar et al., 2006; Soltan e El-Laithy, 2008) nos parâmetros hematológicos em tilápias-do-Nilo.

Durante o estresse, a liberação de catecolaminas estimula a glicogenólise (Martínez-Porchas et al., 2009). A mobilização da glicose em alta quantidade no sangue é comumente utilizada para quantificação do estresse em peixes (Carneiro e Urbinat, 2002; Simões et al., 2014). Neste sentido, os probióticos melhoram a tolerância dos peixes contra agentes estressores de origem ambiental (Lara-Flores et al., 2003; Merrifield et al., 2010) ou promovidos pelo manejo na aquicultura (Varela et al., 2010; Tapia-Paniagua et al., 2014).

No presente trabalho, o alto teor de glicose observado no grupo controle em relação ao tratamento com maior inclusão de probiótico na dieta pode ser reflexo do bem estar do animal frente às condições adversas, seja sobre o manejo, ambientais ou patológicas. Nestas condições, o probiótico utilizado

parece ter influenciado positivamente os níveis de glicose do grupo T2 e T3, ao elevar o patamar homeostático dos peixes. Este fato pode ser comprovado pelo experimento de Mohapatra et al., (2014) que constatou em *Labeo rohita* estressados, menores níveis de glicose nos peixes que receberam probiótico na dieta.

O estresse é um dos fatores que contribuem para o surgimento de doenças primárias e mortalidade de peixes na aquicultura (Rollo et al., 2006). Tanto alterações alimentares quanto ambientais podem promover o estresse do animal modificando a microbiota endógena e o estabelecimento de patógenos no trato gastrointestinal (Tannock e Savage, 1974). Assim, é provável que a melhora no patamar homeostático promovida pelo probiótico neste estudo, possa estar relacionada à maior estabilidade da microflora intestinal com redução de bactérias patógenas durante o tempo de suplementação (Rollo et al., 2006).

A maior concentração de hemoglobina observada nos grupos com menores níveis de inclusão de probiótico na ração pode ser justificada pela necessidade de transporte de oxigênio pelo sangue na tentativa de suprir o aumento da demanda energética do organismo promovida pelo maior nível de glicose (Nikinmaa et al., 1983).

Assim como neste estudo, Reda e Selim (2014) observaram aumento no teor de hemoglobina no sangue ao administrar *B. amyloliquefaciens* para tilápias-do-Nilo. Entretanto, os autores observaram aumento no número de eritrócitos e leucócitos no sangue, mas sem alterações no teor de glicose.

O lúmen intestinal dos peixes é revestido por epitélio colunar simples intercalado com células caliciformes (Reifel e Travill, 1979). A integridade da mucosa intestinal é consequência da intensidade da renovação celular do epitélio e pode ser indicada pela uniformidade de seus vilos e número de células epiteliais e caliciformes que a constitui (Schwarz et al., 2010; Mello et al., 2013).

O aumento da altura das vilosidades observadas no presente estudo resulta em mucosa com maior área de absorção e este fato pode ser justificado pela redução na quantidade de bactérias patógenas ligadas aos

enterócitos. Nesta situação, há maior disponibilidade de nutrientes para as células e redução no processo inflamatório nas criptas, reduzindo a descamação do epitélio. Além disso, é conhecido que algumas proteínas produzidas por bactérias probióticas promovem aumento do tempo de sobrevivência celular do trato intestinal ao inibir a sinalização de apoptose induzida por citocinas nos vilos (Yan et al., 2006, Sherman, 2009).

Mello et al., (2013), ao fornecer *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na dieta de tilápias-do-Nilo, observaram aumento na área de absorção, retenção de nutrientes e consequente aumento no desempenho zootécnico e composição corporal. No presente trabalho, embora a área de absorção intestinal tenha aumentado significativamente, o tempo de avaliação não foi suficiente para refletir em melhorias no desempenho.

A produção de muco pelas células caliciformes é um importante mecanismo de proteção contra a entrada de patógenos pelo trato intestinal (Ellis, 2001). Além disso, o muco que recobre o epitélio atua como um meio de lubrificação, proteção contra produtos tóxicos e transporte entre o conteúdo luminal e células epiteliais (Smirnov et al., 2005).

É bem documentado que os probióticos estimulam o desenvolvimento de células caliciformes no intestino (Dock-Nascimento et al., 2007; Mello et al., 2013; Standen et al., 2013). No presente estudo, os peixes que receberam o maior nível de inclusão de probiótico mostraram número significativamente maior de células caliciformes que o observado no grupo controle. Este resultado corrobora as observações de Reda e Selim (2014), onde também foi encontrado junto ao crescimento do vilo, aumento na contagem de células caliciformes ao administrar *B. amyloliquefaciens* em tilápia-do-Nilo.

Embora o efeito do probiótico no intestino se mostre evidente, nenhuma bactéria probiótica, em forma de bacilo, foi encontrada durante a análise das microfotografias de varredura. Sua ausência no trato gastrointestinal pode ser consequência dos seguintes fatores em conjunto:

- A taxa de colonização de bactérias probióticas no intestino depende da quantidade de bactéria fornecida na dieta (Bagheri et al., 2008). Segundo

Reda e Selin (2014), a administração ideal de *B. amyloliquefaciens* para tilápias-do-Nilo é de altas doses. Neste sentido, o uso de até 10^7 UFC g⁻¹ de ração pode não ser suficiente para suportar o *flush* intestinal em período de jejum.

- A tilápia-do-Nilo é uma espécie tropical cuja temperatura ideal para seu desenvolvimento varia entre 26 e 30°C (Castagnolli, 1992; González e Quevedo, 2001). Segundo Ono e Kubitz (2003), em temperaturas abaixo de 22°C há redução no consumo de alimento e na taxa de crescimento da tilápia-do-Nilo. Durante os últimos 14 dias do período de alimentação, a temperatura da água do cultivo ficou próxima a 22°C. A quantidade de alimento fornecido neste período foi reajustada para todos os grupos, representando redução diária de 18% do consumo da dieta com probiótico.

- A eficiência do probiótico é dependente do sucesso do estabelecimento no intestino do hospedeiro (Nayak, 2010b). Neste sentido, as condições ambientais influenciam profundamente a colonização do intestino tanto por parte da espécie bacteriana quanto do hospedeiro. O potencial de crescimento no interior do intestino e o tempo de residência das bactérias probióticas se tornam mais eficazes em seu intervalo ótimo de temperatura (Panigrahi et al., 2007). Assim, a colonização do intestino pode ter sido prejudicada, uma vez que *B. amyloliquefaciens* é uma bactéria que apresenta crescimento ótimo entre 28 e 40°C (Amore et al., 2013).

- Segundo Aubin et al., (2005), colônias de *Pediococcus acidilactici*, se apresentam em baixo número no intestino após 24 horas de jejum. Da mesma forma, no presente estudo, o tempo de 24 horas de jejum antes da coleta do material biológico para o exame de microscopia pode ser suficiente para eliminar as colônias de *B. amyloliquefaciens* na porção anterior do intestino.

Neste contexto, as características biológicas da bactéria e do hospedeiro, a concentração de probiótico utilizada, as condições ambientais e o manejo empregado na produção, podem gerar resultados controversos quanto à eficácia do probiótico na aquicultura. Assim, mais estudos são necessários para compreender a relação entre estes fatores na sua atuação.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que nas condições testadas, a administração de *B. amyloliquefaciens* não apresentou efeito satisfatório quanto ao desempenho zootécnico. Contudo, o aumento das vilosidades intestinais, número de células caliciformes e a elevação do patamar homeostático observados no presente estudo podem significar um estado de maior higidez do animal.

6. REFERÊNCIAS

- Abd El-Rhman, A., Khattab, Y., Shalaby, A., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 27, 175-180.
- Akoll, P., Konecny, R., Mwanja, W.W., Schiemer, F., 2012. Risk assessment of parasitic helminths on cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.). *Aquaculture*. 356–357, 123-127.
- Aly, S., Mohamed, M., John, G., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*. 39, 647-656.
- Amore, A., Pepe, O., Ventrino, V., Birolo, L., Giangrande, C., Faraco, V., 2013. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. *FEMS Microbiology Letters*. 339, 93-101.
- AOAC, 2000. K. Heilrich (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (17th ed.), AOAC, Arlington, VA, USA (2000).
- Apun-Molina, J., Santamaria-Miranda, A., Luna-Gonzalez, A., Martinez-Diaz, S., Rojas-Contreras, M., 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*. 40, 887-894.
- Aubin, J., Gatesoupe, F., Labbe, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*. 36, 758-767.
- Avella, M., Gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P., Bracciatelli, C., Carnevali, O., 2010. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*. 305, 12-19.
- Ayandiran, T.A., Ayandele, A.A., Dahunsi, S.O., Ajala, O.O., 2014. Microbial assessment and prevalence of antibiotic resistance in polluted Oluwa River,

Nigeria. The Egyptian Journal of Aquatic Research.

Bagheri, T., Hedayati, S., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, A., 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 8, 43-48.

Balcazar, J., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. 114, 173-186.

Boyd, C., Massaut, L., 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering. 20, 113-132.

BRASIL. 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil. 128p.

Campbell, T.W., Mader, D.R., 2006. Chapter 55 - Hemoparasites, Reptile Medicine and Surgery (Second Edition). W.B. Saunders, Saint Louis, pp. 801-805.

Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M., Lu, L., 2011. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A Potential Antagonistic Bacterium against Eel-Pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-7.

Carneiro, P., Urbinati, E., 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei : Characidae), at different densities. Aquaculture International. 10, 221-229.

Castagnolli, N., 1992. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: FUNEP. 189p.

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S., Meseguer, J., Moriñigo, M., Esteban, M.Á., 2012. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. Cell and Tissue Research. 350, 477-489.

Chi, C., Jiang, B., Yu, X.-B., Liu, T.-Q., Xia, L., Wang, G.-X., 2014a. Effects of

three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. Fish & Shellfish Immunology. 36, 9-18.

Chi, C., Liu, J.-Y., Fei, S.-Z., Zhang, C., Chang, Y.-Q., Liu, X.-L., Wang, G.-X., 2014b. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of *A. japonicus*. Fish & Shellfish Immunology. 38, 367-373.

Collier, H.B., 1944. Standardization of Blood Haemoglobin Determinations. Can Med Assoc J. 50, 550-552.

Contreras-Guzmán, E.S., 1994. Bioquímica de pescados e derivados. Jaboticabal: FUNEP, 409p.

Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S., Kamilya, D., 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). Fish & Shellfish Immunology. 35, 1547-1553.

Degefu, F., Mengistu, S., Schagerl, M., 2011. Influence of fish cage farming on water quality and plankton in fish ponds: A case study in the Rift Valley and North Shoa reservoirs, Ethiopia. Aquaculture. 316, 129-135.

Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental & Comparative Immunology. 25, 827-839.

FAO - Food Agriculture Organization of the United Nations, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture (2012). 209 p. Disponível em: www.fao.org/3/a-i3720e.pdf

FAO/WHO, 2001. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Groups Report.: Disponível em: www.fao.org/es/ESN/food/foodanadfood_probio_en.stm

Garcia, F., Kimpara, J.M., Valenti, W.C., Ambrosio, L.A., 2014. Emergy

assessment of tilapia cage farming in a hydroelectric reservoir. *Ecological Engineering*. 68, 72-79.

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am J Clin Pathol*. 56, 35-39.

González, C.E.; Quevedo, E.T. Cultivo de las tilápias roja (*Oreochromis* spp.) y plateada (*Oreochromis niloticus*) 2001, cap.13. p. 283-299. Gomez, H.R.; Daza, P.V.; Avila, M.C.C. Fundamentos de Acuicultura Continental. Bogotá: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, 423p.

Han, Y., Liu, E., Liu, L., Zhang, B., Wang, Y., Gui, M., Wu, R., Li, P., 2015. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydrate Polymers*. 115, 230-237.

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

He, W., Liu, Z., Zhou, W., Mao, P., Ren, T., 2011. Marubashi, E. Ringø. Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*) *Journal of Aquatic Research Developmental*. S1, 005.

Honorato, C.A., Cruz, C.d., Carneiro, D.J., Machado, M.R.F., 2011. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*; v. 48, n. 4.

Jensen, F., Nielsen, M., Nielsen, R., 2014. Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth? *Fisheries Research*. 159, 25-33.

Kaewklom, S., Lumlert, S., Kraikul, W., Aunpad, R., 2013. Control of *Listeria*

monocytogenes on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi). Food Control. 32, 552-557.

Karnatak, G., Kumar, V., 2014. Potential of cage aquaculture in Indian reservoirs. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 1(6), 108–112.

Kersarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J.; Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274,1–14.

Kim, T., Lee, J., Fredriksson, D.W., DeCew, J., Drach, A., Moon, K., 2014. Engineering analysis of a submersible abalone aquaculture cage system for deployment in exposed marine environments. Aquacultural Engineering.

Kumar, R.; Mukherjee, S. C.; Prasad, K. P. and Pal, A. K., 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research. 37, 1215-1221.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M., Guzman-Mendez, B., Lopez-Madrid, W., 2003. 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.

Lazado, C., Caipang, C., 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. Fish & Shellfish Immunology. 39, 78-89.

Lee, J., Rheem, S., Yun, B., Ahn, Y., Joung, J., Lee, S.J., Oh, S., Chun, T., Rheem, I., Yea, H.S., Lim, K.S., Cha, J.M., Kim, S., 2013. Effects of probiotic yoghurt on symptoms and intestinal microbiota in patients with irritable bowel syndrome. International Journal of Dairy Technology. 66, 243-255.

Lim, C.; Webster, C. D., 2006. Tilapia: biology, culture and nutrition. New York: Haworth Press, 678p,

Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L., Luo, L., Pan, Y., 2012. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate

immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). Aquaculture. 342–343, 36–41.

Lončar, N., Gligorijević, N., Božić, N.a., Vujčić, Z., 2014. Congo red degrading laccases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from salt spring in Serbia. International Biodeterioration & Biodegradation. 91, 18-23.

Lovell, R., 1991. Nutrition of aquaculture species. Journal of Animal Science. 69, 4193-4200.

Mahdhi, A., Esteban, M., Hmila, Z., Bekir, K., Kamoun, F., Bakhrouf, A., Krifi, B., 2012. Survival and retention of the probiotic properties of *Bacillus* sp. strains under marine stress starvation conditions and their potential use as a probiotic in Artemia culture. Research in Veterinary Science. 93, 1151-1159.

Martinez-Porchas M., Martinez-Cordova L.R., Ramos-Enriquez R., 2009. Cortisol and glucose: Reliable indicators of stress? Pan-American Journal of Aquatic Sciences. 4, 158-178.

Mello, H.d., Moraes, J.R.E., Niza, I.G., Moraes, F.R.d., Ozório, R.O.A., Shimada, M.T., Engracia Filho, J.R., Claudiano, G.S., 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. Pesquisa Veterinária Brasileira. 33, 724-730.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2009. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 32, 755-766.

Merrifield, D.L., Harper, G.M., Dimitroglou, A., Ringø, E., Davies, S.J., 2010. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Aquaculture Research. 41, 1268-1272.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A., PaniPrasad, K., Mohanta, K., 2014. Beneficial Effects of Dietary Probiotics Mixture on Hemato-Immunology and Cell Apoptosis of *Labeo rohita* Fingerlings Reared at Higher Water Temperatures.

Plos One. 9.

Natt, M., Herrick, C., 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*. 31, 735-738.

Nayak, S., 2010a. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*. 29, 2-14.

Nayak, S.K., 2010b. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*. 41, 1553-1573.

Newaj-Fyzul, A., Austin, B., 2014. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases*, n/a-n/a.

Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus endospores* to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 548-+.

Nikinmaa, M., Soivio, A., Nakari, T., Lindgren, S., 1983. Hauling stress in *Brown trout* (*Salmo-Trutta*) - physiological-responses to transport in fresh-water or salt-water, and recovery in natural brackish water. *Aquaculture*. 34, 93-99.

OECD/FAO. 2013. Food and agriculture Organization of the United Nations Agricultural Outlook: 2014-2023. OECD Publishing. 395p.

Ono, E.A.; Kubitza, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3^a ed. rev. e ampl. Jundiaí: Eduardo Ono, 2003. 112p

Panigrahi, A., Azad, I., 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: The Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry*. 33, 429-440.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., Aoki, T., 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental & Comparative Immunology*. 31, 372-382.

- Priest, F., Goodfellow, M., Shute, L., Berkeley, R., 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp-nov, nom rev. International Journal of Systematic Bacteriology. 37, 69-71.
- Ran, C., Carrias, A., Williams, M., Capps, N., Dan, B., Newton, J., Kloepper, J., Ooi, E., Browdy, C., Terhune, J., Liles, M., 2012. Identification of *Bacillus Strains* for Biological Control of Catfish Pathogens. Plos One. 7.
- Reda, R., Selim, K., 2014. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture International, 1-15.
- Reifel, C.W., Travill, A.A., 1979. Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in ten teleostean species. Journal of Morphology. 162, 343-359.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). Aquaculture. 191, 271-288.
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Estrada, N., Murillo, Y., Ascencio-Valle, F., 2014. Dietary administration of microalgae alone or supplemented with *Lactobacillus sakei* affects immune response and intestinal morphology of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). Fish & Shellfish Immunology. 40, 208-216.
- Ridha, M., Azad, I., 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. Aquaculture Research. 43, 843-852.
- Ringo, E., Gatesoupe, F., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160, 177-203.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A., Carnevali, O., 2006. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. Fish Physiology and Biochemistry. 32, 167-177.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A., 1977. DNA sequencing with chain-

terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74, 5463-5467.

Schwarz K.K., Furuya W.M., Natali M.R.M., Michelato M., Gualdezi M.C., 2010. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias-do-Nilo. Acta Scientiarum Animal Sciences 32(2),197-203.

Scorvo-Filho, J.D., Frasca-Scorvo, C.M.D., Alves, J.M.C., Souza, F.R. A. A., 2010. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. Revista Brasileira de Zootecnia. 39, 112-118.

Shearer, K., 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. Aquaculture. 119, 63-88.

Sherman, P., Ossa, J., Johnson-Henry, K., 2009. Unraveling Mechanisms of Action of Probiotics. Nutrition in Clinical Practice. 24, 10-14.

Simões, L.N., Gomide, A.T.M., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Gomes, L.C., 2012. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Scientiarum. Animal Sciences. 34, 175-181.

Smirnov, A., Perez, R., Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z., 2005. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. Journal of Nutrition. 135, 187-192.

Soltan, M.A., El-Laithy, S.M.M., 2008. Effect of probiotics and some spices as feed additives on the performance and behaviour of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries. 12 (2), 63–80.

Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Grasso, V., Vega, J., Real, F., 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. Veterinary Microbiology. 155, 369-373.

Souza, M.M.d., Aguilar-Nascimento, J.E.d., Dock-Nascimento, D.B., 2007. Effects of budesonide and probiotics enemas on the systemic inflammatory

response of rats with experimental colitis. *Acta Cirurgica Brasileira*. 22, 40-45.

Standen, B.T., Rawling, M.D., Davies, S.J., Castex, M., Foey, A., Gioacchini, G., Carnevali, O., Merrifield, D.L., 2013b. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 35, 1097-1104.

Sun, Y., Yang, H., Ma, R., Lin, W., 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*. 29, 803-809.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Abdullah, M.D.D., Ambok Bolong, A.-M., 2013. Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture*. 416–417, 173-178.

Tannock, G., Savage, D., 1974. Influences of dietary and environmental stress on microbial-populations in murine gastrointestinal-tract. *Infection and Immunity*. 9, 591-598.

Tapia-Paniagua, S.T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M.J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M.A., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2014. The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*. 41, 209-221.

Telli, G., Ranzani-Paiva, M., Dias, D., Sussel, F., Ishikawa, C., Tachibana, L., 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology*. 39, 305-311.

Ten Doeschate, K., Coyne, V., 2008. Improved growth rate in farmed *Halotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*. 284, 174-179.

Tsadik, G.G., Bart, A.N., 2007. Effects of feeding, stocking density and water-

flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture. 272, 380-388.

Varela, J., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijó, S., Leon-Rubio, J., García-Millán, I., del Río, M., Morinigo, M., Mancera, J., 2010. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. Aquaculture. 309, 265-271.

Wang, L., Lee, F., Tai, C., Kuo, H., 2008. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58, 671-675.

Wang, Y., Li, J., Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture. 281, 1-4.

Wedemeyer, G., 1970. Stress of anesthesia with ms-222 and benzocaine in Rainbow trout (SALMO-GAIRDNERI). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 27, 909-&.

Welker, N.E., Campbell, L.L., 1967. Comparison of the α -Amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Bacteriology. 94, 1131-1135.

Wood, A.J.; Gold, H.S.; Moellering-Jr, R. C., 1996. Antimicrobial-Drug Resistance. N Engl J Med, 335, 1445–1453.

Wu, H.-J., Sun, L.-B., Li, C.-B., Li, Z.-Z., Zhang, Z., Wen, X.-B., Hu, Z., Zhang, Y.-L., Li, S.-K., 2014. Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus strains* in mud crab (*Scylla paramamosain*). Fish & Shellfish Immunology. 41, 156-162.

Wu, Z., Feng, X., Xie, L., Peng, X., Yuan, J., Chen, X., 2012. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora. Journal of Applied Ichthyology. 28, 721-727.

Xing, C.-F., Hu, H.-H., Huang, J.-B., Fang, H.-C., Kai, Y.-H., Wu, Y.-C., Chi, S.-C., 2013. Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia

(*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 35, 1122-1128.

Yan, F., Cao, H., Cover, T., Whitehead, R., Washington, M., Polk, D., 2007. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 132, 562-575.

Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C., Rise, M.L., Hall, J.R., Nash, G.W., Gamperl, A.K., 2015. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. 435, 1-9.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M., Takami, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. 252, 516-524.