

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**PREBIÓTICO E PROBIÓTICO NA DIETA DE
TILÁPIA-DO-NILO: PERFIL HEMATOLÓGICO,
RESPOSTA IMUNE INATA E DESEMPENHO
ZOOTÉCNICO**

Eliana Oshiro

Jaboticabal, SP
2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**PREBIÓTICO E PROBIÓTICO NA DIETA DE
TILÁPIA-DO-NILO: PERFIL HEMATOLÓGICO,
RESPOSTA IMUNE INATA E DESEMPENHO
ZOOTÉCNICO**

Eliana Oshiro

Orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Coorientador: Leonardo Tachibana

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.

Jaboticabal, SP
2015

Oshiro, Eliana
O81p Prebiótico e probiótico na dieta de tilápia-do-nilo : perfil
hematológico, resposta imune inata e desempenho zootécnico /
Eliana Oshiro. -- Jaboticabal, 2015
iv, 40 p. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2015

Bibliografia

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Banca examinadora: Carlos Massatoshi Ishikawa, Flávio Ruas de
Moraes

CDU 639.3.043

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


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

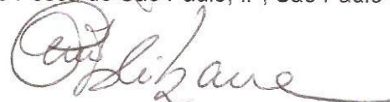
TÍTULO: *Prebióticos e probióticos na dieta de tilápia-do-nilo ;
perfil hematológico, resposta imune inata e desempenho
zootécnico*

AUTORA: ELIANA OSHIRO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , Área:
AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA
Instituto de Pesca de São Paulo, IP, São Paulo-SP


Prof. Dr. CARLOS MASSATOSHI ISHIKAWA
Instituto de Pesca de São Paulo, IP, São Paulo-SP


Prof. Dr. FLÁVIO RUAS DE MORAES
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Data da realização: 31 de agosto de 2015.

SUMÁRIO

Dedicatória	1
Agradecimentos	2
Apoio Financeiro	4
Resumo	5
Abstract	6
1. Introdução	7
2. Objetivos	10
3. Material e Métodos	14
3.1 Instalações e Condições Experimentais	14
3.2 Animais	14
3.3 Dietas	14
3.4 Fase I – Desempenho Zootécnico	16
3.4.1 Outras Análises	17
3.4.1.1 Composição Corporal	17
3.4.1.2 Recuperação das Bactérias Probióticas	17
3.4.1.3 Atividade Fagocítica	17
3.4.1.4 Hematologia	18
3.4.1.5 Lisozima	18
3.4.1.6 Albumina e Proteínas Totais	18
3.5 Fase II – Desafio Experimental	19
3.6 Análises Estatísticas	19
4. Resultados e Discussão	20
4.1 Desempenho Zootécnico	20
4.2 Composição Corporal	21
4.3 Recuperação das Bactérias Probióticas	22
4.4 Lisozima, Albumina, Proteínas Totais e Atividade Fagocítica	23
4.5 Hematologia	26
4.6 Sobrevivência Frente à Infecção Experimental	30
5. Conclusão	31
6. Referências	32

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho realizado com todo meu esforço

Aos meus pais Hitomi Yamauchi Oshiro e Kiyoshi Oshiro pelo incentivo, ensinamentos e apoio de uma vida inteira.

Aos meus irmãos, primos e seus filhos que unem cada dia mais a nossa grande família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr^a. Maria José Tavares Ranzani de Paiva (Masé), pela confiança em mim depositada, sugestões, paciência, e contribuindo assim para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Leonardo Tachibana pela co-orientação, ajuda na elaboração e realização deste projeto.

Ao CAUNESP/Jaboticabal pela oportunidade de realizar a pós-graduação na área de Aquicultura.

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

Aos membros das bancas de qualificação e defesa (Carlos Ishikawa, Danielle Dias e Flávio Moraes) pelas sugestões pertinentes.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP pelo auxílio concedido.

À Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), por conceder a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca: Carlos Ishikawa, Danielle Dias, Elisabeth Romagosa e Leonardo Tachibana pelo conhecimento compartilhado comigo e ajuda imprescindível na coleta final.

A equipe do APTA Pirassununga: Aparecida Mariscal, Claudio Ciola, Dr. Fabio Sussel, Dr. Hécio Marques, Jair Mazzafero, Dr. Marcello Boock e Tereza de Souza pela ajuda e ensinamentos desde o meu período de estágio até a realização deste experimento.

A Letizia Petesse pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Dr. Giovani Sampaio pela disponibilidade de ajudar na formulação das rações.

Aos amigos pós-graduandos de "Pira": Guilherme, Raissa, Ednara, Thais, Mariana, Manoel e Mayara pela ótima convivência, ajuda técnica e braçal.

Às meninas da saudosa Rep. Forfé pela amizade e cooperação fora do "horário de expediente".

Ao Alexandre por ser um namorado incrível! Sempre paciente, carinhoso e divertido. Demonstrando ser alguém com quem eu possa contar em todos os momentos. E à sua querida família pelo apoio e paciência em receber uma hóspede assídua em seu doce lar.

E claro, à minha amada família e amigos pela força, carinho e incentivo em todas as etapas da minha vida.

APOIO FINANCEIRO

CNPq, Bolsa de Mestrado

FAPESP, Projeto aprovado, Processo nº 2014/17967-4

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o desempenho zootécnico, a composição corporal, o perfil hematológico, a resposta imune inata, a taxa de sobrevivência frente à infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* e confirmar a presença do probiótico no intestino de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentados com adição na ração dos prebióticos: Actigen[®] manan oligossacarídeo - MOS (**P1**) e a alga marinha *Kappaphycus alvarezii* (**P2**), além do probiótico PAS-TR[®] composto por *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (**P**). Os aditivos foram testados separadamente e em associação (**S1** = PAS-TR[®] + MOS e **S2** = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*). Sendo um grupo alimentado com dieta controle (**C**). O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira 240 juvenis, com peso médio inicial de 8,86±3,22g, distribuídos aleatoriamente em 6 tratamentos e 4 repetições foram alimentados durante 63 dias com as rações específicas de cada tratamento, para avaliação de desempenho, e coleta de material para as análises propostas. Na segunda etapa, 180 animais foram infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*, após 21 de alimentação teste. O tempo de observação da mortalidade foi de 15 dias pós-inoculação. Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) no desempenho zootécnico, na composição corporal, nas variáveis hematológicas e imunológicas. Foi possível recuperar as bactérias probióticas no trato intestinal dos exemplares alimentados com as dietas adicionadas de probiótico. Os peixes tratados apresentaram melhores índices de sobrevivência ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle quando desafiados com *A. hydrophila*.

PALAVRAS-CHAVE

Simbióticos, nutrição, hematologia, imunologia

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the growth performance, corporal composition, haematological parameters, innate immune response, resistance against the experimental infection with *Aeromonas hydrophila* and confirm the presence of probiotic bacteria in the intestines of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed with addition of prebiotics Actigen[®] MOS - MOS (P1), *Kappaphycus alvarezii* seaweed (P2), and PAS-TR[®] probiotic composed of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* (P). The additives were tested separately and in combination (S1 = PAS-TR[®] + MOS and S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*). One group was fed with control diet (C). The experiment was divided into two stages. In the first stage, 240 juveniles, with initial average weight of $8.86 \pm 3.22\text{g}$, distributed in a completely randomized design of 6 treatments and 4 replications were fed with the specific diets for 63 days. In the second stage, the feeding period was 21 days and the 180 animals were experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* on the 22nd day. The observation of mortality rates period was 15 days post-infection. There were no statistical differences ($p > 0.05$) on performance, corporal composition, haematological and immunological parameters. It was possible to recover the probiotic bacteria in the intestinal tract of exemplary fed with diets containing added probiotics. The fish treated with immunostimulants presented better survival rates ($p < 0.05$) compared to the control group when challenged with *A. hydrophila*, confirming the feasibility of including these in the diet.

KEY-WORDS

Symbiotics, nutrition, hematology, immunology

1. Introdução

O pescado começou a fazer parte da dieta humana devido à pesca nos rios e oceanos e, posteriormente, através da sua produção por meio da aquicultura (TACON & METIAN, 2013), sendo a proteína animal mais consumida no mundo. Portanto, com o esperado aumento da população mundial, o Fundo das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estima a necessidade de acréscimo da produção mundial de pescados em 50 milhões de toneladas por ano.

Em 2012, a produção de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) atingiu 3 milhões de toneladas, sendo a quinta espécie mais criada no mundo (FAO, 2014) e a mais utilizadas nas criações comerciais brasileiras (TURRA et al., 2010). As principais características são rápido crescimento, rusticidade, fácil manejo na criação e boa aceitação da carne pelo mercado consumidor (BOSCOLO et al., 2001; MEURER et al., 2000).

Buscando aprimorar as técnicas de produção da espécie, é notável um crescimento na utilização de regimes intensivos. A produtividade por m³ é evidenciada, mas a ocorrência de situações estressantes é inevitável, pois os animais são submetidos a altas densidades de estocagem, manejos constantes e baixa qualidade da água ao longo do período de criação (MELO et al., 2009), podendo ocasionar queda de imunidade e maior susceptibilidade às doenças (WEDEMEYER, 1969; ALKAHEM, 1994).

A fim de evitar estes fatores, os antibióticos têm sido utilizados de forma indiscriminada no tratamento de doenças bacterianas, profilaticamente e como promotor de crescimento na criação de peixes. Porém, o uso sem prescrição pode ocasionar seleção de bactérias resistentes e poluição ambiental (CABELLO, 2006).

Além disso, devido ao alto custo relativo da ração dentro da criação comercial de peixes, aproximadamente 40% do custo operacional de produção, intensifica-se a busca por alternativas mais eficientes e menos onerosas para formular uma dieta equilibrada, com valor nutricional adequado a suprir as necessidades dos animais (SOUSA, 2010).

Uma dessas alternativas é a adição de probióticos, prebióticos e ingredientes imunestimulantes na dieta dos animais. Os benefícios da utilização destes aditivos são, melhora da eficiência alimentar e da taxa de crescimento, mesmo sob situações de estresse como, por exemplo: transporte, biometria, aclimatação e introdução à alimentação artificial (OLIVEIRA et al., 2002; LIMA et al. 2009). Esses aditivos alimentares também aumentam a resposta imune dos peixes às doenças infecciosas, o que reduz o uso de quimioterápicos na cadeia produtiva (BARBOSA et al., 2005).

Os probióticos são aditivos alimentares à base de microrganismos vivos que contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Eles promovem o aumento da microbiota benéfica, uma vez que competem com microrganismos patógenos, inibindo a sua proliferação, e colaborando conseqüentemente para melhora da digestibilidade, da absorção de nutrientes e do desempenho zootécnico dos animais alimentados (NAYAK 2010).

A adição de bactérias probióticas na dieta animal proporcionam efeitos benéficos como: competição por substrato e nutrientes, resistência à colonização de bactérias patogênicas; produção de compostos antagonistas aos patógenos; aumento da resposta imune e resistência às doenças; melhora da digestibilidade do alimento; da conversão alimentar; da taxa de eficiência proteica e do desempenho produtivo (RINGO e GATESOUBE, 1998; VERSCHUERE et al., 2000; BALCÁZAR et al., 2006; DIAS et al., 2008; KESARCODI-WATSON et al., 2008, BAGHERI et al. 2008, MERRIFIELD et al. 2010b). Além de não contaminar a água dos efluentes, fato que acontece com a utilização de antibióticos na produção (KENNEDY et al., 1998; MORIARTY, 1998).

IRIANTO e AUSTIN (2002) utilizaram diversas bactérias probióticas inativadas para o controle da furunculose em truta arco-íris e relataram o aumento de eritrócitos, linfócitos e macrófagos após 14 dias de alimentação. Sabe-se que as variáveis hematológicas avaliam a sanidade do organismo em um determinado momento, e os elementos sanguíneos relacionam-se quantitativa e proporcionalmente ao estado funcional do peixe (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Estudos realizados com tilápias alimentadas com probióticos, leveduras e aminoácidos demonstraram alterações na morfologia intestinal, promovendo

aumento da quantidade e altura das vilosidades, aumentando a área de absorção da mucosa intestinal e o número de células caliciformes (DE RODRIGANEZ et al., 2009; MERRIFIELD et al., 2010a; CARVALHO et al., 2011; SILVA et al., 2010; MEDRI et al., 1999; HISANO et al., 2006; FABREGAT, 2006). O aumento de células caliciformes da mucosa intestinal de peixes está relacionado com a boa qualidade do microambiente local. As células caliciformes produzem um muco constituído por glicoproteínas insolúveis em água que tem papel importante na proteção contra infecções, pois impede o contato de microrganismos patogênicos com as células epiteliais e tem efeito bactericida devido à presença de lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular (NOGA, 1995). Segundo Radecki & Yokoyama (1991) probióticos adicionados à dieta estimulam o crescimento e a estabilidade de populações bacterianas que produzem ácidos orgânicos que reduzem o pH luminal e inibem a proliferação de bactérias nocivas que contribuem para o processo descamativo do epitélio, favorecendo assim o desenvolvimentos da mucosa intestinal.

Mello et al. (2013) utilizando o probiótico comercial PAS-TR[®], constituído por *Bacillus cereus* ($4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹) e *Bacillus subtilis* ($4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹), na alimentação de tilápia-do-nilo, observaram aumento significativo na eficiência de retenção de proteína, e diminuição da eficiência de retenção de gordura, elevando assim a porcentagem de proteína bruta e diminuindo os valores de extrato etéreo na carcaça.

Bactérias do gênero *Bacillus* são utilizadas como aditivo alimentar na aquicultura por sua resistência à uma ampla variação de temperatura (RENGPIPAT et al. 2000, OCHOA-SOLANO e OLMOS-SOTO 2006). O *Bacillus subtilis* é um dos probióticos mais utilizados na produção animal, classificado como bactéria gram positiva de solo, não patogênica, formadora de esporos que podem crescer numa faixa de temperatura de 8 a 53°C (HARWOOD, 1992); tem como característica ser transitória no trato gastrointestinal, pois não possui a capacidade de se fixar ao epitélio intestinal, mas auxilia na multiplicação e colonização dos produtores de ácido láctico (MARUTA, 1993). Formam endósporos em ambientes inóspitos (VREELAND et al., 2000), característica importante na durabilidade/viabilidade para inclusão em rações animais.

O *B. subtilis* em teste *in vitro* inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila* e, na alimentação da tilápia-do-nilo foi eficaz como promotor de crescimento, além de, aumentar o nível de proteção relativa na infecção experimental com *A. hydrophila*, *Streptococcus iniae* e *Pseudomonas fluorescens* (ALY et al., 2008). El-Haroun et al. (2006) utilizando *B. subtilis* na alimentação de tilápia-do-nilo, observaram aumento no desempenho zootécnico dos animais alimentados com o probiótico.

Bernard et al. (2013) testou *B. cereus* contra *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas putida*, em um ensaio *in vitro*, onde o *B. cereus* mostrou ter um forte efeito antagonista contra estes três agentes patogênicos bacterianos de peixe.

Um estudo realizado com tilápia-do-nilo demonstrou efeitos positivos utilizando duas cepas probióticas (*Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*) como promotores de crescimento em associação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LARA-FLORES et al. 2003). Mello et al. (2013) observaram aumento no percentual de sobrevivência relativa, desenvolvimento das vilosidades, células epiteliais de revestimento e células caliciformes da mucosa intestinal dos peixes tratados.

Em outro experimento incorporando 4,0g do produto composto por *B. subtilis* e *B. cereus* pra cada quilo de ração para tilápias, alimentadas durante 63 dias, Nakandakare et al. (2013), obtiveram aumento da capacidade fagocítica dos peixes em tratamento. Telli et al. (2014) observaram melhora nos valores de lisozima plasmática, índice fagocítico e concentração de hemoglobina corpuscular média dos peixes que consumiram *B. subtilis*, criados na maior densidade de estocagem. A capacidade fagocítica e o índice fagocíticos são variáveis que avaliam a resposta imune não específica dos indivíduos, quantificando o número de células fagocíticas e a sua capacidade de fagocitar microrganismos estranhos ao organismo (SILVA et al., 2005).

Prebióticos segundo a Instrução Normativa nº 13/2004 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) são aditivos zootécnicos, considerados ingredientes que não são digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, mas que são fermentados pela flora bacteriana do trato digestório originando substâncias que estimulam seletivamente o crescimento e/ou

atividade de bactérias benéficas e inibem a colonização de bactérias patogênicas ou indesejáveis. Dentro desse conceito estão alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois de açúcares e oligossacarídeos (GIBSON e ROBERFROID, 1995; SILVA, 2000; JUNQUEIRA, 2001). A maioria dos oligossacarídeos não digestíveis é utilizada como prebiótico, devido a sua seletividade fermentativa (SILVA e NÖRNBERG, 2003).

O mananoligossacarídeo (MOS) é um prebiótico extraído de células de leveduras, e amplamente utilizado nas principais criações animais como promotor de crescimento natural e facilmente adicionado à dieta dos peixes (SILVA e NÖRNBERG, 2003). Segundo Gibson e Roberfroid (1995) e Blondeau (2001), as leveduras são capazes de atuar positivamente no sistema imune e na absorção de nutrientes no intestino anterior.

Em ensaios com juvenis de *Cyprinus carpio*, Culjak et al. (2004) descreveram que a adição de 0,6% de MOS na dieta durante 46 dias resultou em acréscimo no crescimento, maior absorção de proteínas e aumento na taxa de sobrevivência, em comparação ao grupo controle. Com o mesmo período de 21 dias de alimentação pré-infecção que no presente estudo, tilápias-do-nilo suplementadas com 0,6% de MOS, apresentaram maior sobrevivência ao serem desafiadas com *Streptococcus agalactiae* (SAMRONGPAN, et al., 2008).

Salze et al. (2008) observaram que larvas de bijupirá, *Rachycentron canadum*, alimentadas com dietas suplementadas com 0,2% de MOS apresentaram acréscimo de 0,86µm nos vilos intestinais quando comparados aos animais que não receberam ração suplementada. Conforme descrito por Gibson & Roberfroid (1995), os prebióticos em geral não devem ser hidrolisados ou absorvidos no intestino delgado e normalmente atuam como substrato seletivo para determinado grupo de bactérias comensais benéficas, sendo capaz de alterar de forma positiva a microbiota intestinal. Assim, se o trato gastrintestinal está em condições saudáveis, a integridade da mucosa intestinal terá melhores condições de desenvolvimento e desempenho, resultando em uma mucosa com vilos íntegros, de tamanho e densidade maiores, proporcionando incremento do comprimento intestinal.

Um experimento sobre a inclusão de *Saccharomyces cerevisiae* e MOS na dieta para *Oreochromis niloticus*, proporcionou aumento significativo nas proteínas totais séricas e globulinas dos peixes suplementados com 2,0g kg⁻¹ de MOS em relação à dieta basal (ABU-ELALA; MARZOUK; MOUSTAFA, 2013). As proteínas totais do soro estão associadas à resposta inata e são compostas por albuminas e globulinas. O grupo globulina é subdividido em *alfa*, *beta* e *gama*, sendo a fração *gama* a principal fonte de toda a proteína imunologicamente ativa do sangue (ANDREWS et al., 2011; CHOUDHURY et al., 2005). A lisozima, por sua vez, é considerada a primeira barreira contra a ação de bactérias, sendo de grande importância na defesa do organismo. É considerada um parâmetro de diagnóstico da saúde e resistência de peixes (SAURABH e SAHOO, 2008). Aly et al. (2008) relatou aumento da lisozima e da atividade respiratória dos leucócitos em tilápia-do-nilo suplementada com *B. subtilis* e *L. acidophilus*.

As algas marinhas também são utilizadas como prebióticos, pois são ricas em polissacarídeos sulfatados (PS) constituídos por uma gama de moléculas como açúcares raros e grupos sulfato, que devido à sua elevada biodisponibilidade lhes conferem diversas atividades biológicas, tais como: anticoagulante, antitrombótica, antiviral, antitumoral, antiproliferativa e anti-inflamatória (ATHUKORALA et al., 2007). Sua elevada quantidade de fibras, que pode atingir até 75% do seu peso seco, são majoritariamente solúveis lhes conferindo um enorme potencial nutricional. Destas fibras, destacam-se as componentes polissacarídicas, que em regra geral são resistentes às enzimas do trato gastrointestinal, podendo formar géis viscosos no intestino e serem fermentadas pela microbiota normal. Assim sendo, além do potencial nutricional existe potencial prebiótico por parte destes polissacarídeos (RAMNANI, 2012).

De acordo com Chapman e Chapman (1980), uma vantagem da inclusão de algas na dieta humana e animal é a alta disponibilidade dos minerais orgânicos presentes, tornando-os mais assimiláveis. A *Kappaphycus alvarezii* é uma macroalga vermelha marinha, originária da região das Filipinas com atual ocorrência mundial. É a matéria-prima para produção de biopolímeros e carragena, hidrocolóide utilizado como agente espessante e estabilizante em alimentos, fármacos e cosméticos (DOTY 1987, HAYASHI 2007). Estudos fitoquímicos descrevem a presença de elevado teor de proteínas, esteroides, carotenoides,

vitaminas e minerais nesta espécie de alga vermelha (RAJASULOCHANA et al., 2009; NAGARANI e KUMARAGURU, 2012).

Em estudo realizado por Saboya et al. (2012), a adição dos polissacarídeos sulfatados (PS) da *Kappaphycus alvarezii* na ração da tilápia-do-nylo em fase de reversão sexual melhorou a taxa de sobrevivência, peso médio final e ganho médio de peso diário dos peixes, após o estabelecimento de uma situação de estresse na criação (supressão de O₂).

De acordo análises fitoquímicas primárias da *Kappaphycus* sp. realizadas por Rajasulochana et al. (2009), esta macroalga possui utilidade em vários produtos nutricionais para uso como alimento natural ou suplemento nutracêutico. Estudos de composição e ensaios *in vitro* têm sido realizados nos últimos anos, porém ainda são poucos os relatos encontrados na literatura da sua aplicação efetiva comprovando suas propriedades funcionais.

Simbiótico é o termo comercial dado a um aditivo nutricional baseado na associação de microrganismos probióticos e substâncias prebióticas. Essa combinação traz mais benefícios do que ingeri-los separadamente, pois os prebióticos proporcionam um substrato mais adequado para viabilizar e adaptar as bactérias probióticas à microbiota intestinal do hospedeiro, favorecendo sua multiplicação e sua ação funcional (BADARÓ et al., 2008).

AZEVEDO et al. (2015) avaliou economicamente a adição de prebiótico (MOS), probiótico (*B. subtilis*) e simbiótico (MOS + *B. subtilis*) na dieta de juvenis de tilápia-do-nylo observando melhores índices zootécnicos e eficiência econômica nas dietas tratamento em relação ao controle.

2. Objetivos

Avaliar o efeito da inclusão de prebióticos e probióticos na alimentação da tilápia-do-nylo, por meio do desempenho zootécnico, composição químico-bromatológica das carcaças, variáveis hematológicas, resposta imune inata, taxa de sobrevivência frente à infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* e confirmar a presença do probiótico no intestino de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com o probiótico PAS-TR[®] e os prebióticos *Kappaphycus alvarezii* e MOS, testados separadamente e em associação.

3. Material e Métodos

3.1 Instalações e Condições Experimentais

O experimento foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA)/Pólo Regional do Centro Leste/Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP, no período de julho a novembro de 2014.

O delineamento experimental foi inteiramente causalizado. Na Fase I, foram 6 tratamentos e 4 repetições. E na Fase II, foram os mesmos 6 tratamentos em 3 repetições. A unidade experimental foi composta por aquários de 40L de volume útil em sistema de troca diária de água, aeração contínua, controle de temperatura (26°C) e avaliação das variáveis da água (oxigênio dissolvido, pH, amônia total e temperatura).

3.2 Animais

Foram utilizados exemplares revertidos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade GIFT, com peso inicial médio de $8,86 \pm 3,22$ g, distribuídos aleatoriamente em uma densidade populacional de 10 indivíduos/aquário. 240 animais na primeira fase e 180 peixes na segunda.

3.3 Dietas

A composição de cada tratamento e dosagem dos ingredientes encontram-se na Tabela 1. Na Tabela 2 está descrita a formulação das dietas testadas.

Tabela 1 – Aditivos nutricionais incorporados nas dietas para *O. niloticus* e suas concentrações.

Tratamento	Produto	Concentração (g kg ⁻¹)
Controle (C)	-----	-----
Prebiótico 1 (P1)	Actigen® (MOS)	4,0
Prebiótico 2 (P2)	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	4,0
Probiótico (P)	PAS-TR® (<i>B. Subtilis</i> 4x10 ⁸ UFC g ⁻¹ e <i>B. cereus</i> 4x10 ⁸ UFC g ⁻¹)	0,4
Simbiótico 1 (S1)	PAS-TR® + Actigen®	0,4+ 4,0
Simbiótico 2 (S2)	PAS-TR® + <i>K. alvarezii</i>	0,4+ 4,0

Tabela 2 – Composição das rações contendo probióticos prebióticos e simbióticos na alimentação de tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, durante 63 dias.

Ingredientes (%)	Tratamentos			
	Controle (C)	Prebióticos (P1) (P2)	Probiótico (P)	Simbióticos (S1) (S2)
Farinha de penas	4,00	4,00	4,00	4,00
Milho moído	22,74	22,34	22,71	22,31
Farinha de vísceras	15,00	15,00	15,00	15,00
Farelo de soja	18,05	18,05	18,05	18,05
Protenose	3,50	3,50	3,50	3,50
Farelo de trigo	8,56	8,56	8,56	8,56
Quirera de arroz	7,00	7,00	7,00	7,00
Farinha de carne	10,00	10,00	10,00	10,00
Farinha de peixe	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de sangue	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
Fosfato bicálcico	0,32	0,32	0,32	0,32
Óleo de peixe	2,00	2,00	2,00	2,00
Clor. de colina	0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina	0,22	0,22	0,22	0,22
L-Treonina	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina	0,26	0,26	0,26	0,26
Antioxidante	0,05	0,05	0,05	0,05
Antifúngico	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50
PAS-TR®	0,0	0,0	0,04	0,04
Prebiótico	0,0	0,4	0,0	0,4
Composição químico-bromatológica da ração				
Umidade (%)	9,61			
Energia Digerível (mg/Kg)	3150,00			
Proteína Digerível (%)	28,80			
Proteína (%)	36,00			
Extrato Etéreo (%)	7,56			
Fibra Bruta (%)	2,70			
Cinzas (%)	9,42			
Cálcio (%)	2,55			
Fósforo Dis (%)	0,80			
Lisina Total (%)	2,50			
Treonina (%)	1,48			
Metionina Total (%)	0,80			
Vitaminas (mg/Kg)	300,00			

As quantidades de probiótico e prebióticos a serem incluídas foram estabelecidas de acordo com a bibliografia (MELLO et al., 2013 ; NAKANDAKARE et al., 2013; CULJAK et al., 2004; SALZE et al., 2008). As rações experimentais foram formuladas para serem isoprotéicas e isocalóricas com duas granulometrias: 1,0 e 2,0mm diâmetros. Nas dietas Probiótico (P), Simbiótico1 (S1) e Simbiótico2 (S2) a adição das bactérias foi pós-extrusão para não inviabilizar os microrganismos. O probiótico comercial PAS-TR[®] liofilizado contendo *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* foi pesado em balança analítica (0,04% da ração), homogeneizado em óleo de soja (20mL kg⁻¹ de ração) e aspergido sobre a ração para melhor incorporação. A mesma quantidade de óleo foi adicionada às dietas Controle (C) e Prebiótico1 (P1) e Prebiótico2 (P2).

Foram realizadas análises microbiológicas das rações P, S1 e S2. Amostras de 1,0g destas rações foram moídas e diluídas em 9,0mL de água estéril para realização de diluições seriadas até 10⁻⁸, com semeadura de cada concentração em meio Tryptone Soy Agar (TSA) (IRIANTO e AUSTIN, 2002). Estas placas foram incubadas em estufa a 30°C, por 24 h, para posterior contagem das colônias de *Bacillus* spp. (TACHIBANA et al., 2011).

O fornecimento de ração foi realizado quatro vezes ao dia, *ad libitum*.

3.4 Fase I – Desempenho Zootécnico

Teve duração de 63 dias para observar o desenvolvimento dos animais, e viabilizar a coleta de sangue e órgãos. Biometrias foram realizadas a cada 21 dias, obtendo-se o peso e o comprimento total, juntamente com a pesagem da ração. A partir desses valores foram calculados:

- Ganho de Peso (GP):
$$GP = [(peso\ final) - (peso\ inicial)];$$
- Taxa de crescimento específico:
$$TCE = \{100 \times [(\ln\ peso\ final - \ln\ peso\ inicial) \div período]\};$$
- Consumo Médio de Ração (CRM):
$$CMR = [(consumo\ de\ ração) \div (período)];$$
- Conversão Alimentar Aparente (CAA):
$$CAA = [(consumo\ de\ ração) \div (ganho\ de\ peso)]$$

3.4.1 Outras Análises

Ao final dos 63 dias desta primeira fase, amostras foram coletadas para as análises de composição corporal, microbiologia, atividade fagocítica dos fagócitos *in vivo*, variáveis hematológicas, lisozima, albumina e proteínas totais.

3.4.1.1 Composição Corporal

Dois animais inteiros de cada repetição foram enviados ao Laboratório de Bromatologia da USP-Pirassununga para realização das análises de composição corporal. As amostras foram congeladas, moídas e homogeneizadas para determinação de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) de acordo com os métodos propostos pela Association of Official Analytical Chemists (1984).

3.4.1.2 Recuperação das Bactérias Probióticas

Seis exemplares de cada tratamento foram mortos por aprofundamento anestésico com eugenol na concentração de 250 mg L⁻¹ (SIMÕES et al., 2012). Uma porção proximal de intestino de 2,0cm, foi retirada, lavada com água destilada estéril. Pesados, os fragmentos do intestino foram macerados, para posteriores diluições seriadas, em solução salina estéril a 0,7% com imediata semeadura de 0,1mL da solução em superfície de meio de cultura específico (Ágar de Diferenciação de *Bacillus*) e inespecífico (TSA). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas, para posterior contagem das colônias (TACHIBANA et al., 2011).

3.4.1.3 Atividade Fagocítica

Oito peixes de cada tratamento foram anestesiados em eugenol (250 mg L⁻¹), para inoculação na cavidade celomática de 1mL de solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, Tipo II, Sigma, USA) na concentração de 11.000 células mm⁻³. Após 4 horas, os animais foram insensibilizados por aprofundamento anestésico (eugenol 250 mg L⁻¹) e mortos por dissecação medular. Em seguida, a cavidade celomática foi lavada com 1mL de solução salina 0,7%. O líquido aspirado contendo os fagócitos foi centrifugado (1.500xg por 5min) sendo o sobrenadante desprezado. Uma alíquota do sedimentado foi

examinada sobre lâmina e lamínula em microscopia de contraste de fases para determinação da capacidade fagocítica ($CF = \frac{n^\circ \text{ macrófagos fagocitando}}{n^\circ \text{ macrófagos observados}}$) e índice fagocítico ($IF = \frac{n^\circ \text{ leveduras fagocitadas}}{n^\circ \text{ macrófagos fagocitando}}$) segundo Silva et al. (2002, 2005).

3.4.1.4 Hematologia

As amostras de sangue de oito peixes por tratamento foram coletadas por punção do vaso caudal. Imediatamente após a coleta, foram determinadas: glicose plasmática (Gli) com glicosímetro portátil (Accu-Chek Advantage; Roche Diagnosis[®]), número total de células (Red Blood Cells - RBC), contadas em câmara de Neubauer, hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito, taxa de hemoglobina (Hb) por meio do método da cianometahemoglobina e preparação de extensões sanguíneas coradas segundo Rosenfeld (1947) para contagem de trombócitos e contagem diferencial e total de leucócitos (HRUBEC & SMITH, 1998).

A partir dos valores encontrados foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio ($VCM = \frac{Ht \times 10}{RBC}$), hemoglobina corpuscular média [$HCM = \frac{Hb \times 10}{RBC}$] e concentração de hemoglobina corpuscular média [$CHCM = \frac{Hb \times 100}{Ht}$].

O soro foi obtido por centrifugação (2.000xg) do sangue, durante 10 minutos, para ser utilizado nos testes de lisozima, albumina e proteínas totais.

3.4.1.5 Lisozima

Foi determinada pelo método de Kim e Austin (2006) modificado. Utilizando 100µL de soro diluídos com tampão fosfato salino (PBS, 0,05M) em microplacas de 96 poços de fundo plano. A cada poço foi adicionado 100µL de solução de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) com concentração de 0,4mg ml⁻¹ de PBS. As placas foram incubadas e a densidade ótica foi medida a 540nm nos tempos 0, 5, 10 minutos. Uma unidade de lisozima foi determinada como a quantidade necessária para diminuir a absorvância em 0,001min⁻¹.

3.4.1.6 Albumina e Proteínas Totais

A determinação concentração de proteínas totais (PT) foi realizada pelo método do biureto e albumina pelo método do verde de bromocresol, utilizando-se

kits comerciais específicos (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Os valores de globulinas foram obtidos pela subtração entre proteínas totais e albumina.

3.5 Fase II – Desafio experimental

Nesta fase, foi realizado um ensaio prévio a fim de encontrar a dose letal média (DL50) da bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*, para definir a dose a ser utilizada no desafio experimental. Desta forma, 150 peixes, foram distribuídos em 15 aquários de 40L. O inoculo de *A. hydrophila* foi incubado em placas TSA, a 30°C por 24 horas. Após esse período, diluíram-se as colônias em solução PBS estéril. A solução foi homogeneizada por 5 min a 10.000 g, e diluída até a obtenção de quatro concentrações diferentes: 0,50; 0,100; 0,150 e 0,200 Unidades de Absorbância (AU) aferidas em espectrofotômetro (560nm). Cada dose foi diluída a 10^{-9} e plaqueada em TSA para contagem de colônias pós 24h a 30°C. Estabelecendo assim cinco tratamentos avaliados: 0,0; $2,37 \times 10^7$; $1,26 \times 10^8$; $1,64 \times 10^9$; $3,11 \times 10^{10}$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *A. hydrophila* por mL, em triplicata. Todos os peixes foram inoculados intraperitonealmente com 100µL da dose de *A. hydrophila*. Após o período de observação de 15 dias, foi estabelecida como DL50 a concentração de $1,26 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

No desafio experimental, os 180 peixes foram distribuídos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) de 6 tratamentos (Controle, Prebiótico1, Prebiótico2, Probiótico, Simbiótico1 e Simbiótico2) e 3 repetições. O período de alimentação pré-infecção foi de 21 dias com as dietas de seus respectivos tratamentos (SAMRONGPAN, et al., 2008). Ao 22º dia, os animais foram anestesiados com eugenol (250 mg L⁻¹), para inoculação intraperitoneal de 0,1mL da solução contendo *A. hydrophila* [$1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹]. O tempo de observação da mortalidade foi de 15 dias pós-infecção com o diagnóstico da causa *mortis* realizado por meio das observações de sinais clínicos e isolamento da *A. hydrophila* a partir de amostras coletadas do rim cefálico em placas de Petri com meio de cultura TSA, A água proveniente do sistema foi armazenada em caixas para desinfecção com cloro antes do descarte.

3.6 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos ao software Statistica® para avaliação de normalidade e homogeneidade, com análise de variância (ANOVA), seguido

do teste de Dunnet para valores de F que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). O teste não-paramétrico foi utilizado sempre que necessário.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis físico-químicas da água estão representadas na Tabela 3 e não alteraram entre os tratamentos ao longo do experimento. Estando dentro dos padrões adequados para a espécie (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2006).

Tabela 3 - Médias e erro padrão das variáveis da água obtidas ao longo dos experimentos com *O. niloticus*.

Variável	Média
Temperatura	24,8 ± 1,3°C
Oxigênio Dissolvido	4,8 ± 0,8mg.L ⁻¹
pH	6,49 ± 0,5
Amônia Total	0,25mg.L ⁻¹

4.1. Desempenho Zootécnico

Os juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com inclusão dos aditivos nutricionais não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para as variáveis de desempenho zootécnico avaliadas (Tabela 4). Portanto, em relação às variáveis produtivas avaliadas neste trabalho, a suplementação com probiótico e prebióticos não influenciaram o ganho de peso médio (GPM), a taxa de crescimento específico (TCE), a conversão alimentar aparente (CAA) e o consumo de ração médio (CRM).

Tabela 4 - Médias e erro padrão das variáveis de desempenho analisadas no experimento de adição de prebióticos e probiótico na dieta de tilápia-do-nylo.

Tratamento	GPM (g)	TCE (%dia ⁻¹)	CRM (g)	CAA
C	21,52 ± 7,66	2,51 ± 0,24	23,03 ± 7,17	1,19 ± 0,16
P1	16,68 ± 6,16	1,91 ± 0,23	21,06 ± 5,74	1,44 ± 0,24
P2	21,77 ± 3,39	2,10 ± 0,20	24,58 ± 2,66	1,16 ± 0,08
P	20,89 ± 2,88	2,17 ± 0,15	23,23 ± 3,21	1,12 ± 0,03
S1	21,11 ± 4,34	2,39 ± 0,29	22,80 ± 3,74	1,11 ± 0,09
S2	22,09 ± 8,39	2,46 ± 0,11	25,33 ± 7,25	1,35 ± 0,26

C = Controle; P1= Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

Os mesmos resultados foram obtidos por Farias (2012) que testou diferentes níveis de inclusão do probiótico *B. subtilis* e *B. cereus* em dietas experimentais para pacu (*Piaractus mesopotomicus*). Nakandakare (2010) não obteve diferenças significativas quanto a sobrevivência e ganho de peso após fornecer dietas com diferentes métodos de inclusão dos 4,0 g kg⁻¹ de PAS-TR[®] durante 63 dias para juvenis de tilápia-do-nilo.

Resultados diferentes foram descritos por Aly et al. (2008), em experimento com adição de *B. subtilis* na ração (1x10⁷ UFC g⁻¹) de alevinos de tilápia-do-nilo, obtendo maiores ganhos de peso em relação ao tratamento controle.

As diferentes respostas de desempenho zootécnico observadas entre os estudos podem ser atribuídas às diferentes condições experimentais. Uma vez que organismos aquáticos tem maior dependência dos fatores ambientais (oxigênio dissolvido, temperatura, pH e microbiota ambiental) no estabelecimento, proliferação e função das bactérias probióticas no trato intestinal do hospedeiro (DAS et al., 2008; MEHRIM, 2009).

4.2 Composição Corporal

Não houve diferença significativa (p>0,05) na composição bromatológica das carcaças dos peixes quanto à matéria seca, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo (Tabela 5). Schwarz et al. (2011) adicionando MOS na dieta de tilápia-do-nilo em fase de reversão sexual também não obtiveram resultados significativos na análise de composição corporal para os teores de umidade, proteína, extrato etéreo, cinzas, cálcio e fósforo.

Tabela 5 - Composição químico-bromatológica das carcaças de juvenis de *O. niloticus* alimentados com adição de imunostimulantes.

Tratamento	MS	MM*	PB*	EE*
C	95,23	17,82	66,39	20,06
P1	95,00	18,37	69,17	18,34
P2	94,94	18,18	67,79	18,53
P	95,48	18,13	65,92	20,17
S1	90,13	17,47	70,14	19,60
S2	95,78	16,52	64,19	21,74

* Base matéria seca. MS = Matéria Seca; MM = Matéria Mineral; PB = Proteína Bruta; EE = Extrato Etéreo; C = Controle; P1= Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

A utilização de imunostimulantes não alterou a composição química da carcaça dos animais testados. Diferentemente de Mello et al. (2013) que observaram aumento na porcentagem de proteína bruta e diminuição dos valores de extrato etéreo nas carcaças dos peixes alimentados com adição de PAS-TR®. Pode-se sugerir que no presente estudo, o nível de inclusão e a associação proposta entre os aditivos não foi suficiente para alterar o padrão de absorção dos nutrientes que poderiam afetar as variáveis bromatológicas analisadas.

Esses dados podem ser corroborados também pelos achados hematológicos e de desempenho deste trabalho. Porém, estão em contradição aos achados de outros estudos que descrevem, dentre outros benefícios, melhora da digestibilidade e da absorção de nutrientes. Isto devido à mucosa intestinal do hospedeiro estar mais apta à multiplicação das bactérias probióticas e desenvolvimento de maior número de cristas intestinais, células epiteliais de revestimento e células caliciformes nos peixes alimentados com pré e probióticos (BADARÓ et al., 2008; NAYAK, 2010; MELLO et al., 2013). Estes distintos resultados devem-se aos diferentes prebióticos e cepas probióticas utilizados, além dos diferentes tempos de administração.

4.3 Recuperação das Bactérias Probióticas

A Tabela 6 apresenta a contagem de UFC na ração e no trato intestinal dos peixes de cada tratamento. A contagem de UFC de *B. subtilis* e *B. cereus* recuperados do intestino da tilápia mostrou que as dietas Pro e S2 apresentaram maiores valores em relação aos demais tratamentos, porém sem significância estatística ($p > 0,05$), após 63 dias de alimentação. Os peixes do grupo controle apresentaram os menores valores de *B. subtilis* e *B. cereus* ($p < 0,05$) como esperado, uma vez que em sua ração não foi incorporado nenhum tipo de aditivo.

Tachibana et al. (2011) obtiveram respostas semelhantes a este estudo, realizando experimento com pós-larvas de tilápia-do-nilo alimentadas com ração farelada adicionada de 5 e 10 g de *Bacillus subtilis* kg^{-1} , recuperando a quantidade de $1,15 \times 10^4$ e $4,74 \times 10^5$ do intestino. Assim como Telli et al. (2014) em estudo de inclusão do *B. subtilis* ($5,0 \times 10^6$ UFC g^{-1}) na ração de tilápia-do-nilo,

criadas em diferentes densidades de estocagem, também obteve sucesso em recuperar a bactéria no intestino dos animais, após 84 dias de tratamento.

Tabela 6 - Contagem de UFC g⁻¹ na ração ao início do experimento e no trato intestinal de tilápia-do-nilo ao 63º dia nos respectivos tratamentos.

Tratamento	Ração	Trato Intestinal
C	1,1x10 ^{1 a}	1,9x10 ^{2 a}
P1	0,9x10 ^{1 a}	1,4x10 ^{3 ab}
P2	1,3x10 ^{1 a}	1,7x10 ^{3 ab}
P	3,5x10 ^{5 b}	5,6x10 ^{6 b}
S1	2,9x10 ^{5 b}	4,8x10 ^{6 b}
S2	3,9x10 ^{5 b}	5,8x10 ^{6 b}

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Dunnet (p<0,05).

Neste trabalho, os peixes que receberam as rações com adição do PAS-TR[®] (P, S1 e S2) apresentaram maior população de microrganismos no intestino em comparação com os animais cujas dietas não incluíam o produto probiótico. Isto pode ter diminuído a carga bacteriana patogênica devido à competição por nutrientes e produção de compostos inibidores do crescimento de patógenos. Criando, assim, melhores condições para a colonização de bactérias ácido-láticas que por sua vez reduzem a população de bactérias putrefativas. Uma vez que o *B. subtilis*, é classificado como uma bactéria transitória no trato gastrintestinal, não possuindo a capacidade de se fixar ao epitélio intestinal, mas auxilia na multiplicação e colonização das bactérias produtoras de ácido-lático (MARUTA, 1993).

A recuperação das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* no intestino dos peixes em maiores quantidades, atesta a viabilidade destas cepas como probióticos, seja por colonização efetiva ou transitória.

4.4 Lisozima, Albumina, Proteínas Totais e Atividade Fagocítica

Os resultados obtidos das análises de Lisozima, Proteínas Totais (PT), Albumina, Globulinas, Capacidade Fagocítica (CF) e o Índice Fagocítico (IF) não apresentaram diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos. As Tabelas 7 e 8 expõem esses dados.

Tabela 7 – Lisozima, Albumina, Proteínas Totais e Globulina (médias e erro padrão) dos juvenis de *O. niloticus* alimentados com adição de prebióticos, probiótico e simbióticos.

Trat.	Lisozima (unid. mL ⁻¹)	Albumina (g dL ⁻¹)	Proteínas Totais (g dL ⁻¹)	Globulina (g dL ⁻¹)
C	6,28 ± 1,13	0,83 ± 0,05	3,45 ± 0,13	2,62 ± 0,12
P1	7,23 ± 1,40	0,90 ± 0,10	3,46 ± 0,20	2,54 ± 0,17
P2	6,90 ± 1,66	0,80 ± 0,04	3,34 ± 0,18	2,54 ± 0,16
P	4,78 ± 0,98	1,09 ± 0,10	3,52 ± 0,10	2,44 ± 0,12
S1	5,63 ± 1,05	0,89 ± 0,06	3,46 ± 0,18	2,57 ± 0,20
S2	5,45 ± 1,39	0,90 ± 0,08	3,50 ± 0,20	2,60 ± 0,20

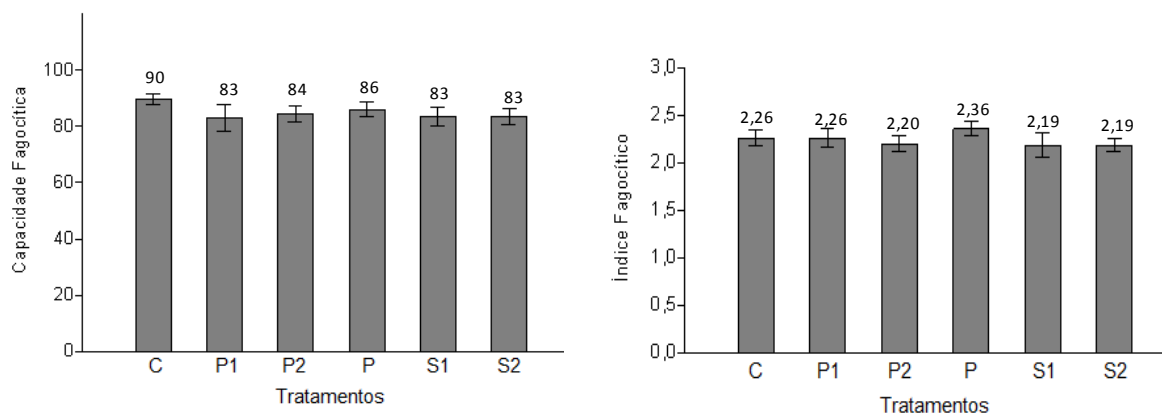
C = Controle; P1= Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

No presente estudo os valores médios das proteínas totais, da albumina e da globulina não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Pode-se observar que a associação simbiótica (prebióticos+probiótico) proporcionou aumento nos valores de globulina sérica. Isto foi verificado, pois os peixes dos tratamentos simbióticos (S1 e S2) tiveram resultados mais elevados que os dos tratamentos em que apenas um dos dois imunostimulantes foi fornecido (P, P1 e P2), porém sem diferença estatística. Um estudo realizado por Wang et al. (2008) com alevinos de tilápia-do-nylo mantidos durante 40 dias com adição do probiótico *Enterococcus faecium* na água, os autores também não verificaram diferenças estatísticas nos níveis séricos de proteínas totais, albumina e globulina. Outra pesquisa sobre a inclusão individual e combinada de *Saccharomyces cerevisiae* (probiótico) e MOS (prebiótico), na dieta para *Oreochromis niloticus*, com dois meses de duração, proporcionou aumento significativo nas proteínas totais e globulinas dos peixes suplementados com 2,0g kg⁻¹ de MOS em relação à dieta basal, indicando, neste caso que o sistema imunológico estava prontamente preparado para defender o organismo, já que as globulinas são a fração principal de proteínas imunologicamente ativas. (ABU-ELALA et al., 2013).

A escolha dos aditivos a serem testados deve ser feita com o propósito de obter algum efeito benéfico ao hospedeiro. Porém, a associação entre pré e probióticos dificilmente potencializa os efeitos benéficos em todas as variáveis avaliadas. Estudos realizados com super-dosagem ou longo período de exposição

ao aditivo podem não apresentar respostas positivas, pois essas estratégias podem provocar tolerância ou desgaste do sistema imunológico, ao ponto de voltarem a seu valor normal ou não reagir mais por exaustão.

No presente trabalho, os níveis de lisozima mantiveram-se sem diferença estatística ($p>0,05$) entre todos os tratamentos testados. Geng et al. (2012) também não detectou efeito ($p>0,05$) dos tratamentos com adição de *B. subtilis*, combinado ou não com o prebiótico quitosana, sobre a atividade de lisozima em bijupirá *Rachycentron canadum*. Telli et al. (2014) observaram que tilápia-do-nilo alimentada com inclusão de *B. subtilis* quando criada durante 84 dias em elevada densidade de estocagem manteve os valores dessa enzima pareados com os tratamentos em baixa densidade, o que não ocorreu com o tratamento controle na alta densidade que apresentou valor abaixo das outras médias ($p<0,05$). Portanto, pode-se constatar que o probiótico foi eficaz em manter a estabilidade da lisozima sob uma condição de estresse, não a alterando em condições normais. O estímulo estressante pode ter influenciado as distintas respostas dos experimentos. A lisozima contribui na defesa inata e nos mecanismos de fagocitose do hospedeiro, estando presente nos grânulos fagocíticos de neutrófilos, monócitos, macrófagos e células epiteliais (COLE et al., 2002; LOPERA et al., 2008).



C = Controle; P1= Actigen®; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR®; S1 = PAS-TR® + Actigen®; S2 = PAS-TR® + *K. alvarezii*.

Figura 1 – Capacidade Fagocítica (%) e Índice Fagocítico (médias ± desvio padrão) dos fagócitos de tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, alimentada com adição de prebióticos e probiótico na ração.

Portanto, uma vez que a lisozima não apresentou diferenças entre os tratamentos, a atividade fagocítica dos fagócitos *in vivo* (CF e IF) que é um indicativo de resistência imune do animal, também não diferiu significativamente entre os tratamentos deste estudo (Figura 1). A capacidade fagocítica (CF) representa a quantidade de macrófagos ativos dentro do número total de macrófagos observados, o índice fagocíticos (IF), por sua vez, informa a quantidade de microrganismos estranhos, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* neste caso, que cada macrófago ativo foi capaz de fagocitar.

Dias et al. (2012) observaram resultados mais elevados de CF em matrinxãs, *Brycon amazonicus*, (262,12 ± 31,95g) alimentadas com *B. subtilis* em comparação com o grupo controle, mas não obteve diferença estatística ao analisar o IF. Telli et al. (2014) observaram que os peixes tratados com *B. subtilis* e criados em alta densidade de estocagem apresentaram maiores valores no IF ($p < 0,05$) em comparação aos outros tratamentos, não diferindo estatisticamente na CF. A variabilidade de resposta entre os trabalhos deve-se a diferença de espécie e de idade dos peixes utilizados no experimento de Dias et al. (2012), sendo animais maiores, portanto mais maduros imunologicamente, e as tilápias de Telli et al. (2014) que estiveram em alta densidade, ou seja, como estímulo estressor durante todo o período de tratamento. O maior tempo de administração (84 dias) de ambas as dietas também pode ter influenciado, uma vez que a bactéria probiótica era a mesma nos três estudos.

4.5 Hematologia

Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) nas variáveis hematológicas dos peixes em tratamento com adição ou não de imunostimulantes na ração. Portanto, a suplementação com prebióticos e probióticos não influenciou a taxa de glicose sérica, bem como o hemograma nas séries branca e vermelha (Tabela 8).

Peixes em condição de estresse respondem fisiologicamente com aumento na glicemia (hiperglicemia) (URBINATI e CARNEIRO, 2001). Os resultados de glicose plasmática deste trabalho mostram que os animais não estavam em condição de estresse, mantendo os níveis normais para a espécie (MOREIRA et al., 2011).

Tabela 8 - Médias e erro padrão da glicose plasmática e das análises hematológicas dos juvenis de tilápia-do-nilo, *O. niloticus* alimentados com prebióticos, probiótico e simbióticos.

Trat.	Gli mg dL ⁻¹	RBC 10 ⁴ μL ⁻¹	Ht %	Hb g dL ⁻¹
C	61,50 ± 5,03	132,50 ± 7,12	33,13 ± 1,22	6,43 ± 0,16
P1	54,38 ± 3,79	131,63 ± 9,98	33,08 ± 0,99	7,09 ± 0,28
P2	43,63 ± 3,61	118,19 ± 6,86	33,56 ± 0,90	6,64 ± 0,14
P	53,13 ± 2,94	118,56 ± 6,76	36,03 ± 1,47	6,61 ± 0,22
S1	50,50 ± 6,81	113,56 ± 8,16	34,84 ± 1,21	6,71 ± 0,31
S2	34,50 ± 5,38	110,00 ± 8,44	35,38 ± 1,37	7,51 ± 0,34

Gli= Glicose plasmática, RBC= Número de eritrócitos, Ht= Hematócrito, Hb= Hemoglobina. C = Controle; P1 = Actigen®; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR®; S1 = PAS-TR® + Actigen®; S2 = PAS-TR® + *K. alvarezii*.

Os dados apresentados para série vermelha deste estudo, após 63 dias de alimentação com as dietas testes, mostraram valor de RBC do P1 (MOS) mais elevado do que nas outras dietas, porém sem diferença significativa. Esses dados diferem dos apresentados por Abu-Elala et al. (2013), que apontaram valores para RBC e Hb significativamente maiores em relação à dieta basal, na dieta contendo 2,0g kg⁻¹ de MOS por 60 dias em *O. niloticus*. Dias et al. (2012), por sua vez, não encontraram diferenças nas variáveis de RBC, Ht e Hb em reprodutores de matrinxã recebendo dietas com *B. subtilis* por 84 dias de alimentação, porém nos primeiros 42 dias RBC e Ht apresentaram diferenças entre os tratamentos. Nakandakare et al. (2013) fornecendo *B. cereus* e *B. subtilis* para tilápia-do-nilo durante 63 dias, notaram diferenças estatísticas de Ht aos 21 dias e de RBC no 42º dia. Após esse período não foram mais encontradas diferenças entre os tratamentos, sugerindo que o pico de resposta do probiótico para essas análises ocorreu antes dos 63 dias de alimentação com probiótico.

Os valores médios de VCM, HCM e CHCM (Tabela 9) não mostraram diferença estatística entre os tratamentos e foram semelhantes aos verificados por Telli et al. (2014) que também não encontraram diferença entre os tratamentos de baixa e alta densidade de estocagem, com ou sem adição de probiótico na alimentação de tilápia-do-nilo. Assim como, Nakandakare et al. (2013) não relataram diferença no 63º dia de alimentação experimental de seus peixes para nenhum dos índices hematimétricos.

Tabela 9 - Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de *O. niloticus* alimentados durante 63 dias com adição de prebióticos, probiótico e simbióticos.

Tratamento	VCM fL	HCM pg cel ⁻¹	CHCM g dL ⁻¹
C	253,72 ± 12,47	49,53 ± 2,92	19,50 ± 0,47
P1	273,59 ± 16,57	55,21 ± 2,94	20,37 ± 0,79
P2	290,90 ± 18,44	57,58 ± 3,49	19,85 ± 0,41
P	310,63 ± 21,48	56,73 ± 3,02	18,50 ± 0,80
S1	314,94 ± 18,52	60,27 ± 3,24	19,26 ± 0,63
S2	320,23 ± 15,10	68,07 ± 3,37	21,27 ± 0,54

VCM= Volume Corpuscular Médio, HCM= Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM= Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. C = Controle; P1 = Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

Neste estudo os valores do número de trombócitos foram inferiores (Tabela 10) aos constatados por Ueda et al. (1997) e Farias (2012), que observaram a variação de 38.540,00-100.800,00 μ L⁻¹. Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), além da variação interespecífica, as diferenças metodológicas empregadas na contagem de trombócitos são responsáveis por essas diferenças acentuadas.

Embora trombócitos e leucócitos sejam células de linhagens diferentes, sob o ponto de vista da Patologia podem ser agrupados nas contagens relativas e denominados células sanguíneas de defesa do organismo (TAVARES-DIAS et al., 2000). Diversos autores atribuíram a estas células funções como a coagulação (CASILLAS e SMITH, 1977) e fagocitose (HILL e ROWLEY, 1996) em peixes.

Tabela 10 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) do número absoluto de trombócitos de *O. niloticus* alimentados com adição de prebióticos e probiótico na dieta.

Tratamento	Trombócitos
C	17761,13 ± 5968,42
P2	6398,82 ± 2458,27
P1	12886,28 ± 4992,40
P	9222,41 ± 2008,81
S1	14252,89 ± 1454,11
S2	12522,76 ± 2736,29

C = Controle; P1= Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

Os valores de contagem de células brancas (total e diferencial) deste experimento encontram-se de acordo com os valores encontrados por Tavares-Dias e Moraes (2004). A variação do número de linfócitos, neutrófilos e monócitos também não foi significativa entre os tratamentos (Tabela 11). Os resultados obtidos são semelhantes aos reportados por Nakandakare (2010) ao suplementar juvenis de tilápia-do-nilo com *B. subtilis* e *B. cereus*, e Dias et al. (2012) ao suplementar *Bacillus subtilis* para matrinxã pois também não foram observadas diferenças entre os tratamentos, em ambos os trabalhos.

Assim como neste trabalho, Bittencourt et al. (2003) não encontraram basófilos ou eosinófilos, nem seus precursores, no sangue periférico de *O. niloticus*, criados em sistema semi-intensivo. Estas células normalmente, em sangue de peixes, ocorrem em número muito baixo, não passando de 1,5% dos leucócitos totais, aparecendo em maior quantidade quando os animais apresentam alguma reação alérgica ou infecção por parasitos (RANZANI-PAVA et al., 2013).

Tabela 11 - Valores médios e erro padrão da média das contagens total e diferencial de leucócitos (número μL^{-1}) dos juvenis de tilápia-do-nilo, *O. niloticus* alimentados com adição de imunostimulantes na dieta.

Trat.	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
C	25225,59 ± 2966,43	22302,68 ± 2992,28	1760,02 ± 492,06	1162,89 ± 528,43
P1	20471,05 ± 2710,33	18881,94 ± 2660,05	982,94 ± 163,94	606,17 ± 188,59
P2	23421,92 ± 3403,35	20575,84 ± 3096,35	1912,95 ± 429,54	933,12 ± 251,26
P	29500,03 ± 4804,29	27046,21 ± 4967,65	1502,54 ± 524,88	951,28 ± 221,22
S1	21459,84 ± 3551,43	18416,97 ± 3320,21	2146,67 ± 391,64	896,20 ± 232,59
S2	23762,73 ± 3023,91	21427,05 ± 3127,96	1727,40 ± 504,68	608,27 ± 117,45

C = Controle; P1 = Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

O fornecimento de probiótico na dieta dos peixes pode provocar imunostimulação (JATOBÁ et al., 2011) ocasionando um alerta/preparo para possíveis infecções; portanto, seria recomendado fornecer o probiótico antes de situações de alto estresse ou períodos de incidência de doenças. Neste estudo não foi observada alteração no número de células brancas com o fornecimento do probiótico *B. subtilis* e *B. cereus* na dieta. Possivelmente, as alterações possam ocorrer em períodos bastante curtos após o início da alimentação, não

possibilitando a detecção das mudanças pela metodologia empregada. A invariabilidade destas células nos animais alimentados com dietas contendo o pro e prebióticos, em relação ao grupo controle, pode ser explicada pela ausência de estímulo de antígenos. Ou a ação de estimulação das células de defesa, possa ocorrer em outros períodos e/ou dosagens de administração dos imunostimulantes especificamente para *O. niloticus*.

Esses resultados se relacionam com os obtidos na análise de composição corporal dos peixes, que também não foram diferentes entre os tratamentos. Não houve alteração na absorção dos nutrientes que poderiam alterar a capacidade imune ou sanguínea dos animais.

4.6 Sobrevivência Frente à Infecção Experimental

Ao longo dos 15 dias após a inoculação com a bactéria patogênica foram observadas alterações comportamentais e aparecimento de sinais clínicos como: natação errática, apatia, perda de escamas, petéquias, exoftalmia, erosão e hemorragia nas nadadeiras dos peixes infectados.

Nas análises da infecção experimental verificou-se que os peixes alimentados com a dieta Controle apresentaram taxa de sobrevivência de 53,57% após o desafio com *A. hydrophila*. Este valor foi significativamente ($p < 0,05$) mais baixo em comparação com os peixes dos outros tratamentos alimentados com prebióticos e/ou probiótico na dieta. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos de animais (P1, P2, P, S1 e S2) que foram alimentados com as dietas-teste (Figura 3).

Farias (2012) obteve resultados semelhantes em experimento realizado com pacus submetidos à dieta suplementada com o probiótico comercial PAS-TR[®] por 60 dias antes da infecção experimental com *A. hydrophila*. Aly et al. (2008) ao adicionarem *B. subtilis* e *L. acidophilus* na dieta de truta arco-íris observaram menores taxas de mortalidade após o desafio com *A. hydrophila* e *P. fluorescens*.

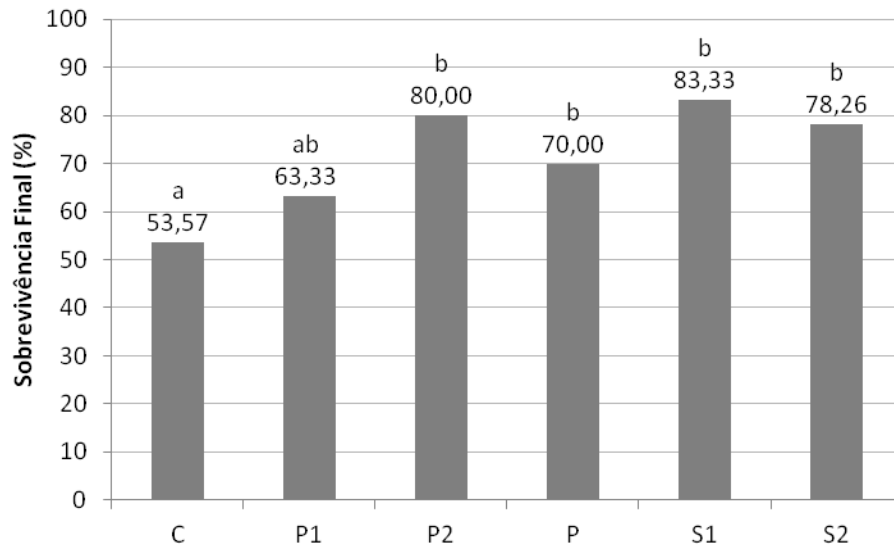


Figura 2 - Taxa de sobrevivência pós-infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* de *O. niloticus* alimentados com adição de prebióticos e probiótico.

Letras diferentes diferem significativamente segundo teste de Dunnett ($P < 0,05$). C = Controle; P1 = Actigen[®]; P2 = *K. alvarezii*; P = PAS-TR[®]; S1 = PAS-TR[®] + Actigen[®]; S2 = PAS-TR[®] + *K. alvarezii*.

Os resultados desta etapa do estudo sugerem que as dietas para tilápia-do-nilo com prebióticos e probiótico administradas por 21 dias, promoveram melhoria na imunidade não-específica, pois os animais alimentados com essas dietas apresentaram melhores índices de sobrevivência em comparação aos alimentados com a dieta controle, proporcionando maior proteção aos peixes quando desafiados com *A. hydrophila*.

5. CONCLUSÃO

A inclusão dos probióticos e prebiótico não afetou as condições imunológicas, hematológicas, de desempenho zootécnico e de composição corporal dos animais testados. Foi possível recuperar as bactérias probióticas (*B. cereus* e *B. subtilis*) no trato intestinal das tilápia-do-nilo cujas dietas foram adicionadas com o probiótico comercial testado. Os peixes desafiados com *A. hydrophila* cujas dietas continham aditivos apresentaram melhores índices de sobrevivência ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. As dietas S1 e S2 não diferiram estatisticamente das dietas P, P1 e P2 para as variáveis analisadas neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. 2013. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, 1:21–29
- ALKAHEM, H.F. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **Journal of University Kuwait Science**, 21:243-252.
- ALY, S.M.; AHMED Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.M. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish immunology**. 25:128-136.
- ANDREWS S.R., SAHU N.P., PAL A.K., MUKHERJEE S.C.; KUMAR S. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. **Research in Veterinary Science**, 91(3):103-109.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1984. **Official Methods of Analysis**. 12th ed. Washington, D.C. 1015p.
- ATHUKORALA, Y.; LEE, K. W.; KIM, S. K.; JEON, Y. J. 2007. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, 98(9):1711-1716.
- AZEVEDO, R.V.; FOSSE FILHO, J.C.; CARDOSO, L.D.; MATTOS, D.C.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; ANDRADE, D.R. 2015. Avaliação econômica de prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tilápia-do-nilo. **Revista Ciência Agrônômica**, 46(1), 72-79.
- BADARÓ, A.C.L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V.; STRINGHETA, P.C. 2008. Alimentos Probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – Parte 1. Nutrir gerais. **Revista Digital de Nutrição**. v.2, n.3.
- BAGHERI, T.; HEDAYATI, S.A.; 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.
- BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, 114:173-186.
- BARBOSA, T.M.; HENRIQUES, A.O.; WOODWARD, M.J.; RAGIONE, R.M.; SERRA, C.R. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(2):968-78.

BERNARD, V.H.; NURHIDAYU, A. INA-SALWANY, M.Y.; ABDELHADI, Y. 2013. *Bacillus cereus*; JAQ04 Strain as a Potential Probiotic for Red Tilapia; *Oreochromis* Species. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, 8:395-400.

BITTENCOURT, N.L.R.; MOLINARI, L.M.; SCOARIS, D.O.; PEDROSO, R. B.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T.U.; ABREU FILHO, B.A.; DIAS FILHO, B.P. 2003. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. **Acta Scientiarum**, 25: 385-389.

BLONDEAU, K. 2001. **La paroi des levures: Structure et fonction, potentiels therapeutiques et technologiques**. Université Paris Sud. Paris. 18p.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; SOARES, C.M. 2001. Farinhas de peixe, carne e ossos e vísceras e crisálida como atractantes em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n. 5, p. 1397-1402.

CABELLO, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, 8(7):1137-1144.

CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; COSTA, D.S.P.; MOREIRA, E.L.T.; PINTO, L.F.B.; ABREU, R.D.; ALBINATI, R.C.B. 2011. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, 12(1):176-187.

CASILLAS, E. e SMITH, L.S. 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, 10: 481-491.

CHAPMAN, V.J. e CHAPMAN, D.J. 1980. **Seaweeds and their uses**. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido. 334p.

CHOUDHURY D., PAL A.K., SAHU N.P., KUMAR S., DAS S. S. AND MUKHERJEE S.C. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish & Shellfish immunol.** 19(3): 281-291

COLE, A.M.; LIAO, H.I.; STUHLIK, O. 2002. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. **Journal of Immunology**, Bethesda, 169:6985-6991.

CULJAK, V.; BOGUT, I.; HAS-SCHÖN, E.; MILAKOVIC, Z.; CANECKI, K. 2004. Influence of mananoligosaccharides supplementation on juvenile carp (*Cyprinus carpio*) in cage farming. **Krmiva**. 46(1):25-29.

DAS, S.; WARD, L.R.; BURKE, C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Applied Microbiology and Biotechnology** 81:419–429.

DE RODRIGANEZ, M.S.; DIAZ-ROSALES, P.; CHABRILLON, M.; BALEBONA; M.C., SMIDT, H.; ARIJO, S.; LEÓN-RUBIO, J.M.; ALARCÓN, F.J., MORIÑIGO, M.A.; CARA, J.B.; MOYANO, F.J. 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile *Senegalese sole* (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture Nutrition**, 15:177–185.

DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M. 2008 Uso de probiótico em ração de rã-touro, *Rana catesbeiana*: desempenho produtivo. **Archivos de Zootecnia**, 57:449-455.

DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORREA, C.F.; BORDON, I.C.A.C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2012. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. **Journal of Applied Ichthyology**, 28:40-45.

DOGGETT, T.A. e HARRIS, J.E. 1989. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, 33: 747-756.

DOTY, M.S. 1987. The Production and Use of Eucheuma. *In*: Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources Doty, M.S., Caddy, J. F., Santelices, B. (eds). **FAO Fisheries Technical Papers**, 281 Rome, 123-161.

EL-HAROON, E.R.; GODA, A.M.A.S.; CHOWDHURY, A.K. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feces utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, 37(14):1473-80.

ELLIS, A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. **Journal of Fish Biology**, 11: 453-491.

FABREGAT, T.E.H.P. 2006 **Utilização do prebiótico flavofeed® como suplemento dietário para juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 42p.

FARIAS, T.H.V. 2012. **Probiótico na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*): avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e desempenho produtivo**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista. 92p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Fish farms to produce nearly two thirds of global food fish supply by 2030. Rome: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**, 2014.

GENG, X.; DONG, X.H.; TAN, B.P.; YANG, Q.H.; CHI, S.Y.; LIU, H.Y.; LIU, X.Q. 2012. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish Shellfish Immunol**, Oxford, 31:400-406.

GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Bethesda, (125):401-412.

HARWOOD, C.R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnology**, 10:247-256.

HAYASHI, L. 2007. **Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenanas**. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 100p.

HILL, D.J. e ROWLEY, A.F. 1996. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **Britany Journal of Haematology**, 92: 200-211.

HISANO, H.; SILVA, M. D. P.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L.E. 2006. Levedura integra e derivados do seu processamento em rações para tilápia-do-nilo: aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum**, 28:311-318.

HRUBE, T.C. e SMITH, S.A. 1998. Hematology of fish, p. 1120-1125. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Blackburg: Wiley-Blackwell.

IRIANTO, A. e AUSTIN, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, 25: 333-342.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; SILVA, B.C.; SEIFTER, W.Q.; ANDREATTA, E.R. 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology and Biochemistry**, 37: 725-732.

JUNQUEIRA, O. M. 2001. Avanços na nutrição de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA III CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA. (XI: 2001: Goiânia). **Anais**. Goiânia: UFG.

KENNEDY, S.B.; TUCKER, J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER V.R., JARRELL J.L. & SENNETT D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: A case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). **Bull. Mar. Sci.** 62:573-588.

KESARCODI-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):1-14.

KIM, D.H. e AUSTIN, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. **Fish Shellfish Immunology**, 21:513-524.

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMAN-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.

LIMA, P. C. W. C.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; SOUSA, J. J.; FARIAS, W. R. L. 2009. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, 40(1):79-85.

LOPERA, D.; ARISTIZABAL, B.H.; RESTREPO, A.; CANO, L.E.; GONZÁLES, A. 2008. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 50:169-175.

MARUTA, K. 1993. Probióticos e seus benefícios. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos. **Anais**. Santos: APINCO. 203-219.

MEDRI, V.; PEREIRA, G. V.; LEONHARDT, J. H.; PANINI, M.S.; DIETZEL, S. 1999. Avaliação sensorial de files de tilápias alimentadas com diferentes níveis de levedura alcooleira. **Acta Scientiarum**, 21:303-308.

MEHRIM, A. 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 Sciences**. 4:261–273

MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G.; MORAES, F.R.; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; ENGRACIA FILHO, J.R.; CLAUDIANO, G.S. 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(6):724-730.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; MELO, M.M.; JÚNIOR, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; GUIMARÃES, S.R. 2009. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(5):1183-1190.

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

MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M.; DAVIES, S.J. 2010b. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. **Aquaculture. Nutrition**. 16:504-510.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES C.M.; BOSCOLO, W.R. 2000. Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, 22(2):479-484.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa nº 13/2004. Diário Oficial da União de 01/12/2004, seção 1, 63p.

MORIARTY, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, 164:351-358.

MOREIRA, A.G.L.; TEIXEIRA, E.G.; MOREIRA, R.L.; FARIAS, W.R.L. 2011. Glicose plasmática em juvenis de tilápia-do-nilo anestesiados com óleo de cravo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 12(3):794-804p.

NAGARANI, N. e KUMARAGURU, A.K. 2012. Chemical characterization, temperature stability and enzymatic studies on edible marinealgae *Kappaphycus alvarezii* (Doty). **Journal of Aquatic Food Product Technology**. 21:480–492.

NAKANDAKARE, I.B. 2010. **Inclusão de probióticos durante o processamento de ração para tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, variação Gift**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura e Pesca). Instituto de Pesca, São Paulo. 74p.

NAKANDAKARE, I.B.; IWASHITA, M.K.P.; DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ROMAGOSA, E. 2013. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca** 39(2):121-135.

NAYAK, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish Shelf Immunology**. 29(2):14.

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

OCHOA-SOLANO, J.L. e OLMOS-SOTO, S.J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiology**. 23:519-525.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO J.H.A.; SAAD, S.M.I. 2002. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38(1):1-21.

RADECKI, S.V.; YOKOYAMA M.T. 1991. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition, In: **Miller E.R., Duane E.U. & Lewis A.J. (Eds), Swine Nutrition**. Butterworth-Heinemann, Boston. p.439-447.

RAJASULOCHANA, P.; DHAMOTHARAN, R.; KRISHNAMOORTHY, P. 2009. Primary Phytochemical Analysis Of *Kappaphycus Sp*. **Journal of American Science** 5(2): 91-96

RAMNANI, P.; CHITARRARI, R.; TUOHY, K.; GRANT, J.; HOTCHKISS, S.; PHILP, K.; CAMPBELL, R.; GILL, C. e ROWLAND, I. 2012. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. **Anaerobe**. 18:1-6.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. 2013. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1. ed. Maringá: Eduem. 140 p.

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.

RINGO, E. e GATESOUBE, F. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, 160:177-203.

ROSENFELD, G. 1947. Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias Instituto Butantã**, 20:329-334.

SABOYA, J.P.S. ARAUJO, G.S.; SILVA, J.W.A.; SOUSA, J.J.; MACIEL, R.L.; FARIAS, W.R.L. 2012. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Kappaphycus alvarezii* em pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a situações de estresse. **Acta Scientiarum, Animal Science**. Maringá, 34(3):215-221.

SALZE, G.; CRAIG, S. R.; SCHWARZ, M.; MCLEAN, E. 2008. Novel live feed enrichments beneficially impact digestive ontogeny in larval cobia *Rachycentron canadum*. **Abstract of Aquaculture America**, (08):337.

SAMRONGPAN, C.; AREECHON, N.; YOONPUNDH, R.; SIRSAPOOME, P. 2008. Effect of mannan oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) fry. In: **8th International Symposium On Tilapia In Aquaculture**; October 12e14. p. 345e53. Cairo, Egypt.

SAURABH, S. e SAHOO, P.K. 2008. Lisozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, Oxford, 39:229-239.

SCHWARZ, K.K.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M.; GAUDEZI, M.C.; LIMA, P.A.G. 2011. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40(12): 2634-2640.

SILVA, E. N. 2000. Probióticos e Prebióticos na alimentação de aves. **Conferência Apinco' 2000**. São Paulo: Facta.

SILVA, J.R.M.C.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES J.C.S.; JENSCH-JUNIOR B.E. 2005. Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. **Polar Biology**, 28(4):326-328.

SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES J.C.S. 2002. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Nototheniacoriiceps*. **Journal Fish Biology**, 60:466-478.

SILVA, L. C. R.; FURUYA, W.M.; NATALI, M. R. M.; SCHAMBER, C.R.; SANTOS, L.D.; VIDAL, L.V.O. 2010. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. **R. Bras. Zootec.**, 39(6):1175-1179.

SILVA, L.P. e NÖRNBERG, J.L. 2003. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, 33, (5):983-990.

- 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**, 34(2):175-181.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; BACCARIN, A.E.; BRAGA, F.M. de S. 2006. Limnological parameters and plankton community responses in Nile tilapia ponds under chicken dung and NPK (4-14-8) fertilizers. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 18(3):335-346.
- SOUSA, A.D.L. 2010. **Mananoligossacarídeo e β -glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápia-do-nilo mantidos em tanques rede**. Tese (Doutorado em Aquicultura) Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 42p.
- TACHIBANA, L.; DIAS, D.C.; ISHIKAWA, C.M.; CORREA, C.F.; LEONARDO, A.F.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2011. Probiótico na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758): desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. **Bioikos**, 25(1): 25-31.
- TACON, A.; METIAN, M. 2013. Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. **Reviews in Fisheries Science**, 21(1):22–38.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2004. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ed. Eletrônica e Arte Final. Riberão Preto. SP. 144p.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C.; MORAES, F.R. 2000. Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolophis hornorum* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., Rio de Janeiro, 3-7/set./2000. Anais... Rio de Janeiro: ISTA. p.533-541.
- TELLI, G. S.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; DIAS, D.C.; SUSSEL, F.R.; ISHIKAWA, C.M.; 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(2): 305-311.
- TURRA, E. M.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, E.A.; LUZ, R.K.; PRADO, S.A. MELO, D.C.; FARIA, P.M.C.; SOUSA, A.B. 2010. Controle reprodutivo em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 34(1): 21-28.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. 1997 Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 34: 270-275.
- URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. 2001. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleost: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, 16(1): 75-85.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64:655-671.

VREELAND, R.H.; ROSENZWEIG, W.D.; POWERS, D.W. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. **Nature**, 407(6806):897-900.

WANG, Y.; TIAN, Z.; YAO, J.; LI, W. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, 277:203-207.

WEDEMEYER, G. 1969. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 29(3):1247–1251.