GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQÜICULTURA E PESCA

INCLUSÃO DE PROBIÓTICOS NO PROCESSAMENTO DE RAÇÃO PARA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* VARIEDADE GIFT

Ivan Bernardoni Nakandakare

Orientador: Elizabeth Romagosa
Co-orientador: Leonardo Tachibana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do titulo de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo
Julho – 2010

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQÜICULTURA E PESCA

INCLUSÃO DE PROBIÓTICOS NO PROCESSAMENTO DE RAÇÃO PARA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* VARIEDADE GIFT

Ivan Bernardoni Nakandakare

Orientador: Elizabeth Romagosa
Co-orientador: Leonardo Tachibana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do titulo de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo
Julho – 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

N145i Nakandakare, Ivan Bernardoni

Inclusão de probiótico no processamento de ração para tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, variedade Gift. / Ivan Bernardoni Nakandakare. -- São Paulo, 2010.

iii, 63f.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Elizabeth Romagosa

1. *Bacillus*. 2. *Ciclídeos*. 3. Desempenho zootécnico. 4. Hematologia. 5. Histologia. 6. Imunologia. I. Romagosa, Elizabeth. II. Título.

CDD 639

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECONOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQÜICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Inclusão de probiótico durante o processamento de ração para juvenis de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* variedade Gift

AUTOR: IVAN BERNARDONI NAKANDAKARE

ORIENTADORA: Profª. Dra. Elizabeth Romagosa

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:

E Romagosa
Profª. Dra. Elizabeth Romagosa

Eduardo Makoto Onaka
Prof. Dr Eduardo Makoto Onaka

Prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni

Data da realização: 16 de agosto de 2010

E Romagosa
Presidente da Comissão Examinadora
Profª. Dra. Elizabeth Romagosa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Seijo Nakandakare*** e ***Roseclair Bernardoni Nakandakare****,* pois, sem uma base sólida com exemplos de caráter e dignidade, torna-se difícil transpor as barreiras que a vida nos impõe, pelo grande exemplo de vida, educação, confiança, estímulos constantes em todos os momentos da minha vida e apoio nas horas de felicidades e mais difíceis;

Aos meus sogros, ***Mauro Iwashita*** e ***Maria Aparecida Pieroni Iwashita***, por me acolherem tão bem em sua casa e os quais aprendia a admirar pelas suas qualidades e caráter;

À minha noiva, ***Marina Keiko Pieroni Iwashita***, meu ”morzão”, pela dedicação, apoio, incentivo, companheirismo, ajuda durante os trabalhos e paciência nos momentos de felicidade e horas mais difíceis em todas as fases da dissertação.

A todos os meus amigos que de uma forma ou outra me ajudaram a conquistar esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de muitas pessoas na qual gostaria de prestar aqui sinceros agradecimentos, especialmente:

A orientadora e mãe científica, Dra. *Elizabeth Romagosa*, pela competente orientação, oportunidade, confiança a mim depositada, atenção e paciência desde a concepção da dissertação e em acreditar que chegaríamos ao final desta empreitada;

Ao co-orientador, Dr. *Leonardo Tachibana*, pelas valiosas idéias fornecidas, ajuda na redação, interpretação e análise dos os dados;

A Dra. *Maria José Tavares Ranzani de Paiva*, "sogra" científica, por ceder gentilmente seu laboratório para a realização deste experimento além de, auxiliar nas coletas e sugestões nos artigos científicos;

A MSc. *Danielle de Carla Dias* "cunhada" científica e ao Dr. *Carlos Massatoshi Ishikawa*, pelos momentos agradáveis juntos e à ajuda durante a realização deste trabalho;

Aos pesquisadores Dra. Yara Aiko Tabata e MSc. Marcos Guilerme Rigolino, por me dar vários conselhos e apoio desde a graduação até o fim do mestrado;

Ao *Instituto de Pesca APTA/SAA-SP* pela viabilização logística deste trabalho junto ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca, bem como, a todos os professores e pesquisadores do Programa de Pós-graduação do Instituto de Pesca;

A *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo* - FAPESP pela concessão da bolsa de estudos processo número 2009/01530-8;

A *Empresa IMEVE Biotecnologia – Indústria de Medicamentos Veterinários Ltda* por conceder o probiótico utilizado no experimento;

A *Empresa Fri-ribe S/A* pela concessão dos ingredientes para a ração;

A *Universidade Federal de São Carlos* - UFSCar pela utilização da extrusora;

Ao *Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP*, pelo uso da peletizadora, bem como, seus funcionários e amigos que fiz durante minha estadia no centro;

Aos *Laboratórios de Microbiologia e de Nutrição Animal da UNESP* de Jaboticabal, pelas análises prestadas;

Ao Laboratório de Endocrinologia de Peixes da USP, em especial a Dra *Maria Inês Borella*, ao técnico de laboratório *Cruz Alberto Mendoza Rigonati*; ao docente *Renato Lamounier Barbieri* pela orientação na parte histológica e os amigos que fiz por lá;

A Dra. *Neuza Sumico Takahashi* e a Dra. *Cláudia Maris Ferreira* – Instituto de Pesca APTA – São Paulo, pelas sugestões e críticas no Exame de Qualificação;

Ao Dr. *Eduardo Makoto Onaka* – Instituto de Pesca, APTA – São José do Rio Preto e *Sérgio Ricardo Batlouni* - Centro de Aquicultura da UNESP, pelas sugestões e críticas no Exame de Defesa de Dissertação;

Aos colegas da pós-graduação, *Natalia, João, Ricardo, Camila, Débora, Ariane, Felipe,* e os funcionários do Instituto de Pesca, *João Batista, Sérgio, Cibele;*

As "eternas" estagiárias *Thais Helena Vaz de Farias* e *Cynthia Venâncio Ikefuti*, pela ajuda nas coletas durante o experimento

Aos moradores e amigos da República Pau da Goiaba, *Atchim, Burro, Duendi, Haroldo, J-lhão, Tampax, Pogobol, Rafael, Roberto, Splinter, Traveko, Yoshi,* dentre outros, que passaram por lá, por me acolherem tão bem durante minha estadia em Jaboticabal;

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

	Páginas
Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. A Tilápia	4
3.2. Suplementação alimentar	6
3.3. Definição do probiótico	7
3.4. Mecanismos de ação do probiótico	8
3.5. Benefício do probióticos	8
3.6. Cuidados do uso de probióticos na aquicultura	8
3.7. Processamento de ração	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
5. APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	14
CAPÍTULO 1	15
INCLUSÃO DE PROBIÓTICO NO PROCESSAMENTO DE RAÇÃO PARA JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus*: **DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E HISTOMORFOMETRIA DA PORÇÃO MÉDIA DO INTESTINO**	15
Resumo	16
1. Introdução	17
2. Material e métodos	18
2.1. Parâmetros zootécnicos	20
2.2. Parâmetros histológicos	20
2.3. Análises estatísticas	21
3. Resultados e discussão	21
3.1. Qualidade da água	21
3.2. Desempenho zootécnico	22
3.3. Histomorfometria da porção média do intestino do trato intestinal	25

4. Conclusões 27
5. Agradecimentos 27
6. Referências bibliográficas 27
7. Apêndices 33
CAPÍTULO 2 36
INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICO NA DIETA PARA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus*: **PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS** 36
Resumo 37
1. Introdução 38
2. Material e métodos 39
2.1. Análises hematológicas 41
2.2. Imunologia 42
2.3. Microbiologia 42
2.4. Análises estatísticas 43
3. Resultados e discussão 43
4. Conclusões 53
5. Agradecimentos 53
6. Referências bibliográficas 54
7. Apêndices 61
CONSIDERAÇÕES FINAIS 63

Resumo
Os probióticos constituídos por microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do peixe e deve ser capaz de colonizar, estabelecer-se e multiplicar no intestino do hospedeiro. A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus,* variedade GIFT é um ciclídeo que apresenta excelente potencial zootécnico e reprodutivo. Objetivou-se neste experimento avaliar a otimização do desempenho zootécnico, caracterizar histomorfometricamente a porção média do intestino, estimar os parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos em dietas para jovens, alimentados com probiótico, incluído antes e após o processo de peletização e extrusão da ração. Utilizou-se o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco réplicas: ração peletizada sem probiótico; ração peletizada com inclusão de probiótico antes e após o processamento; ração extrusada sem probiótico e ração extrusada com inclusão do probiótico após o processamento. Duzentos e cinqüenta exemplares foram distribuídos em 25 aquários (20L) e alimentados durante 63 dias. Foram constatadas diferenças para os valores médios do peso total no final do experimento. Após 42 dias de alimentação foram ocorridas diferenças significativas na conversão alimentar para tratamentos com as dietas extrusadas comparadas com as peletizadas. Os peixes alimentados com as dietas suplementados com o probiótico apresentaram aumento na espessura da camada epitelial do intestino. As análises hematológicas não apresentaram diferenças significativas durante o período experimental. A capacidade fagocítica foi maior na dieta extrusada suplementada com probiótico, todavia, o índice fagocítico não mostrou diferenças entre os tratamentos. Os peixes alimentados com a dieta extrusada suplementada com 4g kg^{-1} de probiótico incluído após o processamento foram os que apresentaram melhores resultados de desempenho zootécnico, histomorfométrico e imunológico.

Palavras chaves: *Bacillus*, ciclídeos, desempenho zootécnico, hematologia, histologia, imunologia.

Abstract
Probiotics consisted of live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host and must be able to colonize, establish and multiply into the intestine of the fish. The Nile tilapia, *Oreochromis niloticus,* GIFT variety it is a cichlid that shows an excellent zootechnical and reproductive potential. The objective of this assay was to evaluate the performance; characterize histomorphometrically the middle portion of the intestine, estimate the parameters hematological, immunological and microbiological in diets for young fed with diets, included with probiotics before and after processing pelleting and extrusion ration. The experimental design was completely randomized with five treatments and five replicates: a pelleted diet without probiotic; pelleted diet with probiotic included of before and after processing, extruded diet without probiotic, and extruded diet with probiotic inclusion after processing. Two hundred and fifty fishes were assigned into 25 aquaria (20L) and fed for 63 days. It was observed significant differences for the total weight. After 42 days of fed, it was observed significant differences in the feed convertion in treatments with extruded diets compared with the pelletized diets. Fishes fed with diets supplemented with probiotic shown an increase in the thickness of the intestine epithelial layer. No significant differences were observed in blood analysis during the experimental period. The phagocytic capacity was enhanced in the extruded diet supplemented with probiotic, however, the phagocytic index showed no difference among the other treatments. The fishes fed with the extruded diets supplemented with $4g.kg^{-1}$ probiotic included after the processing showed the best results in growth performance, immunologic and histomorphometric parameters.

Keywords: *Bacillus*, cichlids, growth performance, hematology, histology, immunology.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Profissionais da iniciativa privada associados a instituições de ensino e de pesquisa anseiam pela viabilização de alimentos funcionais como os probióticos, constituídos por microrganismos vivos que atuam beneficamente no hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal favorecendo a saúde dos animais, definição esta que foi mencionada por FULLER (1989). Em outubro de 2001, a FAO/OMS, intitulou o termo probiótico como "microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro".

Recentemente, NAYAK (2010) afirma que um probiótico ideal, independente da sua fonte deve ser capaz de colonizar, estabelecer e multiplicar no intestino do hospedeiro.

Mais recentemente, os probióticos considerados na indústria da aquicultura incluem uma vasta gama, como as bactérias Gram positivas especialmente bactérias ácido láticas, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus spp*, as bactérias Gram negativas *Aeromonas*, *Alteromonas*, bifidobactérias, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio spp*. e as leveduras, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* (VERSCHUERE et al., 2000; IRIANTO e AUSTIN, 2002; LARA-FLORES et al., 2003; BURR et al., 2005; SAHU et al., 2008; WANG et al., 2008; ALY et al., 2008; EL-RHMAN et al., 2009), dentre outros.

Partindo do conhecimento científico adquirido sobre a utilização de probióticos em peixes, tem se estabelecido linhas de investigação prioritárias sobre sua suplementação nos alimentos (em geral, rações) e, administrados oralmente para melhorar a flora microbiana do intestino (NAGESWARA e BABU 2006; SAHU et al., 2008), exercendo efeito benéfico através de uma ampla gama de ações. Estes incluem competição por sítios de adesão e resistência à colonização; competição por nutrientes essenciais; produção de compostos antagonistas contra-patógenos; reforço da resposta imune e resistência a doenças; melhoria da digestibilidade na alimentação e desempenho produtivo (RINGO e GATESOUPE,

1998; VERSCHUERE et al., 2000; BALCÁZAR et al., 2006; DAS et al., 2008; KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Sabe-se que os probióticos são usados na criação de larvas, pós-larvas e juvenis de peixes, moluscos, crustáceos e anfíbios (RINGO e GATESOUPE, 1998; PLANAS e CUNHA, 1999; VERSCHUERE et al., 2000; IRIANTO e AUSTIN, 2002; BALCÁZAR et al., 2006; ALY et al., 2008; DIAS et al., 2008; KESARCODI-WATSON et al., 2008; EL-RHMAN et al., 2009; ZHOU et al., 2009; NAYAK, 2010) possibilitando substituir os antibióticos na função de promotor de crescimento.

Entre os numerosos efeitos benéficos dos probióticos, a modulação do sistema imunológico é um dos mais comumente alegados em peixes (NAYAK, 2010). Segundo o autor modelos animais favorecem a compreensão do grau e tipo de resposta imune induzida pelos diferentes produtos. Afirma também, que entre os parâmetros imunes estudados em teleósteos, os mais comuns são os que interagem com as células do sistema imunológico, tais como células mononucleares fagocíticas (monócitos e macrófagos), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células NK para melhorar as respostas imunes inatas. Certos probióticos podem aumentar o número de eritrócitos, granulócitos, macrófagos e linfócitos em diferentes peixes (IRIANTO e AUSTIN, 2002; KUMAR et al., 2008).

A piscicultura no nosso país, como atividade rural, surgiu na década de 1950, no Estado de São Paulo, com a introdução do cultivo da carpa comum, *Cyprinus carpio*, truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* e tilápias (CASTAGNOLLI, 1995). Várias introduções de tilápias foram realizadas no Brasil para a consolidação da tilapicultura, destacando-se a *Tilapia rendalli*, no ano de 1952 (GODOY, 1959), a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* e a tilápia Zanzibar, *Oreochromis hornorum*, no ano de 1971 (DA SILVA et al., 1975). As introduções mais recentes constituíram-se de linhagens da tilápia Nilótica, a tilápia Chitralada em 1996, e mais recentemente a tilápia Gift e a tilápia Supreme (ZIMMERMANN, 1999, 2003).

A tilápia do Nilo é um ciclídeo que apresenta características como precocidade, rápido crescimento, alimenta-se dos itens básicos da cadeia trófica, aceita grande variedade de alimentos, responde com a mesma eficiência a

ingestão de proteínas de origem vegetal e animal, possui capacidade fisiológica de adaptar-se em diferentes ambientes e sistemas de produção, resistente a doenças, densidades de estocagem elevadas e baixos teores de oxigênio dissolvido, além de atrair a atenção dos piscicultores por ser uma espécie de peixe consolidada na atividade dos agronegócios (CASTAGNOLLI, 1992; ONO e KUBITZA, 2003; ZIMMERMANN e FITZSIMMONS, 2004; CYRINO e CONTE, 2006). Estas características conferem à tilápia o segundo lugar dos peixes mais cultivados em águas continentais no mundo, perdendo apenas para a carpa (YASUI et al., 2007).

O gênero *Bacillus* pode agir positivamente sobre os organismos cultivados, aumentando a sobrevivência e o crescimento (GOMEZ-GIL et al., 2000), estimulando o sistema digestivo (ZIAEI-NEJAD et al., 2006) e o sistema imunológico (GATESOUPE, 1999) contribuindo na melhoria da qualidade da água em termos de biorremediação (KENNEDY et al., 1998; MORIARTY, 1998). Estudos mostram efeitos positivos usando uma ou duas cepas probióticas, e alguns descrevem os efeitos da mistura de probióticos na piscicultura e carcinicultura (BALCÁZAR, 2003; LARA-FLORES et al., 2003; ZIAEI-NEJAD et al., 2006).

No presente estudo foi utilizado um produto constituído por *Bacillus toyoi* e *Bacillus subtilis*, que tem como características capacidade de esporular, contribuindo com taxas de sobrevivência elevadas durante o trânsito intestinal (HOA et al., 2000).

O conhecimento de mucosa intestinal dos peixes é importante no fornecimento de informações em estudos de nutrição, de forma a atender às exigências nutricionais para adequado desempenho e saúde dos peixes. Segundo JOBLING (1995), a mucosa intestinal de peixes teleósteos tem inúmeras projeções denominadas vilos, sem criptas na base e que possuem células indiferenciadas, que sofrem sucessivas mitoses para formação das células epiteliais do vilo.

SWEETMAM et al., (2008) afirmam que a função do trato intestinal e sua eficiência é fundamental para o sucesso comercial da produção de peixes, por meio de estudos histológicos, estabelecendo o padrão e integridade estrutural.

Após a administração, existem maneiras de avaliar os efeitos dos probióticos fornecidos aos peixes como colonização do epitélio intestinal, contribuições nutricionais das bactérias, função estimulante imunológica (TINH et al., 2008) bem-estar do animal e crescimento (AVELLA et al., 2010; CARNEVALI et al., 2004; 2006; MERRIFIELD et al., 2010).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste experimento foi de avaliar o processo de incorporação de probiótico em dois diferentes processamentos de rações em dietas formuladas: (1) peletização e (2) extrusão.

Dentre os objetivos específicos foram testadas as incorporações do probiótico nas dietas experimentais de jovens de tilápias do Nilo com o intuito de:

- Otimizar o desempenho zootécnico;
- Mostrar o efeito da presença do probiótico nas microvilosidades do intestino;
- Estimar os parâmetros hematológicos à melhora de imunidade;
- Verificar a recuperação do probiótico adicionada à ração e do trato intestinal;
- Determinar o protocolo de incorporação de probiótico nas dietas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A Tilápia

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes, pertencente à família Cichlidae. É nativa da África tropical (WATANABE et al., 2002), do vale Jordan e da costa do Rio Palestina (HERBST, 2002), porém, apenas quatro conquistaram destaque na aquicultura mundial: tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*; tilápia de Moçambique, *O. mossambicus*; tilápia azul, *O. aureus* e tilápia de Zanzibar, *O. urolepis hornorum* (KUBITZA, 2000).

Estes peixes estão distribuídos em águas quentes subtropicais cujas médias de temperatura da água variam entre 20 e 30 °C, e podem ser cultivadas em água doce, estuarina ou salobra (MEURER et al., 2003), em países dos

hemisférios norte e sul, especialmente no Oriente Médio e Ásia (SOUZA, 2007). A tilápia é a segunda espécie de águas continentais mais cultivada em todo o mundo, sendo inferior apenas às carpas (OSTRENSKY et al., 2000; YASUI et al., 2007).

A piscicultura no nosso país, como atividade rural, surgiu na década de 1950, no Estado de São Paulo, com a introdução do cultivo da carpa comum, *Cyprinus carpio*, da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* e das tilápias do Nilo (CASTAGNOLLI, 1995). Várias introduções de tilápias foram realizadas no Brasil para a consolidação da tilapicultura, destacando-se a *Tilapia rendalli*, no ano de 1952 (GODOY, 1959), a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, no ano de 1971, e a tilápia Zanzibar, *Oreochromis hornorum*, em 1971 (DA SILVA et al., 1975). As introduções mais recentes constituíram-se de linhagens da tilápia Nilótica, a tilápia Chitralada em 1996, e mais recentemente a tilápia Supreme e a tilápia Gift (ZIMMERMANN, 1999, 2003).

Em 1996, uma linhagem melhorada de crescimento rápido da espécie *O. niloticus*, a tilápia Chitralada, foi introduzida no Brasil. Esta linhagem foi desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio de Chitral na Tailândia, a partir de alevinos doados pelo Asian Institute of Technology (AIT) (ZIMMERMAN, 1999). Uma nova linhagem de tilápia foi recentemente introduzida no mercado brasileiro, a tilápia Supreme, desenvolvida pela empresa Genomar, depois de mais de 20 anos de seleção genética. A população GST (Genomar Supreme Tilapia) é produto do maior, mais caro e longo programa de melhoramento genético de tilápias, o Genetic Improved Farmed Tilapia (GIFT), que foi executado nas Filipinas (ZIMMERMANN, 2003).

A tilapicultura cresce impulsionada pelo potencial zootécnico e reprodutivo da espécie que quando criadas em cativeiro, mostram ser de fácil manejo, resistência ao manejo e às enfermidades (CARRILLO e ROMAGOSA, 2005).

Por apresentar carne saborosa de ótima qualidade (2,1% gordura) e a inexistência de espinhos em forma de "y" (miocelos) no filé, característica que facilita a industrialização (HILDSORF, 1995; YASUI et al., 2007) é bem aceita

pelo mercado consumidor regional e internacional (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994; SOUZA, 2007).

Embora seja uma espécie exótica, a tilápia do Nilo, é uma das principais espécies com potencial para alicerçar a expansão da piscicultura industrial no Brasil, pois, a espécie está adaptada às nossas condições climáticas e sua criação é feita a partir de um pacote tecnológico bem definido (LOVSHIN, 1998).

Do ponto de vista biológico, a tilápia é onívora, alimentando-se de algas, fitoplâncton, zooplâncton, ovos e larvas de peixes e detritos. Esta característica faz com que a tilápia cresça rapidamente com a utilização de níveis baixos de proteínas e tolere altos níveis de carboidratos na dieta, em comparação com os peixes carnívoros (STICKNEY, 2000).

Com a crescente necessidade de utilizar alimentos de alta qualidade e em quantidades suficientes para atender o crescimento da população mundial, esforços integrados de segmentos da produção animal e vegetal (PEZZATO et al., 2004) e pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de alimentos funcionais, que forneçam nutrição básica, promovendo aumento da eficiência alimentar, taxa de crescimento e a melhora da saúde de peixes (OLIVEIRA et al., 2002).

3.2. Suplemento alimentar

Na aquicultura os suplementos alimentares mais estudados são as vitaminas, minerais, imunoestimulantes, prebióticos e probióticos (GATLIN III et al., 2006).

Com relação aos pré e probióticos, pode-se dizer que ambos os produtos possuem a mesma função que é reduzir a carga de bactérias indesejáveis do trato intestinal dos peixes, favorecendo a saúde do animal e melhorando a absorção dos nutrientes da dieta. Os prebióticos são compostos não digeríveis por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrintestinal. Podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem adicionados a ela, através de fontes exógenas concentradas (SILVA e NÖRNBERG, 2003).

Entretanto, probióticos são produtos que contêm um ou vários microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alteram, por colonização, a microbiota própria do intestino do hospedeiro, produzindo também efeitos benéficos à saúde (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001).

O desenvolvimento de protocolos de utilização de suplementos alimentares é fundamental para a administração correta desses produtos segundo GARCIA (2008). Apesar de não apresentarem maiores problemas de impacto ambiental e registro de uso, estes produtos mostram resultados positivos quando administrados na concentração exata que o organismo necessita e ainda, durante um período correto, que geralmente é bastante curto (JENEY et al., 1997). O limiar entre o suplemento expressar seus benefícios e tornar-se prejudicial é estreito, daí a dificuldade de se estabelecer os protocolos de utilização (VOLPATTI et al., 1998). Além disso, a “exigência” do suplemento varia com inúmeros fatores como, idade do peixe, sistema de criação, composição da dieta e estresse (desafio) a que estão submetidos.

3.3. Definição do probiótico

Na década de 1960, LILLY e STILLWELL (1965) descreveram probióticos para humanos como "substâncias secretadas por um organismo que estimulam o crescimento de outro". Até meados de 1974, o termo probiótico foi focado na alimentação animal por Parker como "organismos e substâncias que têm um efeito benéfico sobre o hospedeiro do animal, contribuindo para o equilíbrio microbiano intestinal".

A definição mais amplamente citada foi expressa por FULLER (1989) como, "Um microrganismo vivo suplementado na dieta, o qual beneficia o animal hospedeiro por melhorar o balanço microbiano intestinal". Em outubro de 2001, a FAO/OMS, intitulou o termo probiótico como, "microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro".

Recentemente, KESARCODI-WATSON et al., (2008) ressaltaram que, os probióticos em peixes são microorganismos vivos que podem servir como suplementos dietéticos para melhorar o crescimento e a resposta imune.

3.4. Mecanismos de ação do probiótico

Existem três mecanismos de ação atribuídos aos probióticos sendo, (1) supressão do número de células viáveis pela produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e sítios de adesão; (2) alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; (3) estímulo da imunidade do hospedeiro, pelo aumento dos níveis de anticorpos e atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989; CORRÊA et al., 2003).

3.5. Benefícios dos probióticos

Os probióticos podem ser benéficos de várias formas agindo separadamente ou em combinação com outros probióticos. Dentre as ações estão incluídas a inibição do patógeno (produção de compostos antagônicos), concorrência pela adesão de sítios, competição por nutrientes, funções imunoestimulatórias como os benefícios nutricionais alimentares para melhorar a digestibilidade para facilitar sua digestão (FULLER, 1989; BOMBA et al., 2002).

3.6*. Cuidados no uso de probióticos na aquicultura*

As cepas de probióticos usadas na alimentação podem não estar disponíveis para o hospedeiro devido a diferentes formas. Portanto, a dosagem deve ser apropriada. Muitas cepas bacterianas não sobrevivem ao processo de confecção do alimento, perdem sua viabilidade quando expostas a altas temperaturas e ao processo de extrusão. Grandes quantidades de material orgânico concentrado no fundo do viveiro também podem diminuir a eficiência do probiótico utilizado (ANTONY e PHILIP, 2008).

3.7. Processamentos de ração

Hoje, as rações peletizada ou extrusada são utilizadas pelas indústrias de alimentos nas criações comerciais de organismos aquáticos e, segundo FANCHER (1996), o processo mecânico de peletização trata-se da aglomeração de pequenas partículas, originando partículas maiores, denominando-as de "peletes", cujos ingredientes devem estar em ótimas condições para a produção de grânulos de alta qualidade nutricional e boa estabilidade na água. ALVES (2007) mostra também que, a aglutinação dos ingredientes em forma de "pelete" é importante para minimizar as perdas sólidas e dissolvidas (nitrogênio e fósforo), aumentando a eficiência da ingestão do alimento, conferindo ao produto final uma melhor digestibilidade da parte energética da ração. Entretanto, KIANG (1993) afirma que o processo de extrusão utiliza altas temperaturas e pressão, causando modificações físicas e químicas nos alimentos, provocando maior gelatinização do amido e exposição dos nutrientes contidos no interior das células vegetais à ação digestiva, melhorando, assim, a eficiência alimentar para os peixes.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. M. C. 2007. A indústria de ração no Brasil: interface com a pesquisa. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, Unesp Botucatu,SP. *Anais...* Botucatu: Aquanutri, CD-ROM.

ALY, S. M., AHMED, Y. A. G., GHAREEB, A. A. A., MOHAMED, M. F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus,* as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 128-136.

ANTONY, S. P., PHILIP, R. 2008. Probiotics in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 59-63.

AVELLA, M. A., OLIVOTTO, I., SILVI, S., PLACE, A. R., CARNEVALI, O. 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 298: 359-371.

BALCÁZAR, J. L. 2003. *Evaluation of probiotic bacterial strains in Litopenaeus vannamei*. Final report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.

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.

BOMBA, A., NEMCOVÁ, R., MUDROŇA, D., GUBA, P., 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 121-126.

BURR, G., GATLIN, D., RICKE, S., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of World Aquaculture Society*, 36: 425-436.

CARNEVALI, O., ZAMPONI, M. C., SULPIZIO, R., ROLLO, A., NARDI, M., ORPIANESI, C., SILVI, S., CAGGIANO, M., POLZONETTI, A. M., CRESCI, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, 12: 377-386.

CARNEVALI, O., DE VIVO, L., SULPIZIO, R., GIOACCHIN, G., OLIVOTTO, I., SILVI, S., CRESCI, A. 2006. Growth improvement by probiotic European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture,* 258: 430-438.

CARRILLO. M., ROMAGOSA. E. 2004. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): tempo pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 31: 55-64.

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

CASTAGNOLLI, N. 1995. Status of Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, 26: 35-39.

CORRÊA, G. S. S., GOMES, A. V. C., CORRÊA, A. B., SALLES, A. S., MATTOS, E. S. 2003. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55: 467-473.

CYRINO, J. E. P., CONTE, L. 2006. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). AquaCiência 2004: *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura.* Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, cap.12, 151-171.

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

DA SILVA, A. B., MELO, F. R., LOVSHIN, L. L. 1975. *Observações preliminares sobre a cultura monossexo da Tilapia nilótica Linnaeus (macho) em viveiro, em comparação com híbridos machos de Tilapia, com o uso de ração suplementar e fertilizantes*. Fortaleza: DNOCS, pp 8.

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.

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

FANCHER, B. I. 1996. Feed processing using the annular gap expander and its impact on poultry performance. Journal Applied Poultry Research, 5: 386-394.

FAO/WHO, 2001. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 1-4 October 2001, Cordoba, Argentina. Available at: ftp://ftp.fao.org/ es/esn/food/probio_report_en.pdf acessado em 23/08/2009.

FULLER, R. 1989. A review: probiotic in man and animals. *Journal Applied Environmental Microbiology*, 63: 1034-1039.

GARCIA, F. 2008. *Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede*. 100 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, Jaboticabal.

GATESOUPE, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture,* 180: 147-165.

GATLIN III, D. M., LI, P., WANG, X., BURR, G. S., CASTILLE, F., LAWRENCE, A. L. 2006. Potential Application of Prebiotics in Aquacuclture. In: VIII AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 371-376.

GODOY, M. P. 1959. *Criação de Peixe*. Pirassununga: Estação Experimental de Biologia e Piscicultura. 2ª ed. São Paulo. pp 24.

GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., TURNBULL, J. F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.

HERBST, E.C. 2002. *Induction of tetraploidy in zebrafish, Danio rerio and Nile Tilápia* ***Oreochromis niloticus***. Carolina do Norte. 48p. (Dissertação de Mestrado. Universidade de North Carolina at Carlotte).

HILDSORF, A. W. S. 1995. Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*, 22: 73-78.

HOA, N. T., BACCIGALUPI, L., HUXHAM, A., SMERTENKO, A., VAN, P. H., AMMENDOLA, S., RICCA, E., CUTTING, S. M. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5241-5247.

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

JENEY, G., GALEOTTI, M., VOLPATTI, D., JENEY, Z., ANDERSON, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154: 1-15.

JOBLING, M. 1995. *Environmental biology of fishes*. London, Chapman & Hall, 455p.

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*). *Bulletin of Marine Science*, 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: 1-14.

KIANG, M. J. 1993. La extrusion como herramienta para mejorar el valor nutritivo de los alimentos. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ACUACULTURA. Nuevo León. *Anais...* Nuevo León: Universidad de Nuevo León. 1993, 415-429.

KUBITZA, F. 2000. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: Kubitza. F. pp.289.

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

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.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748.

LOVSHIN, L. L. 1998. Red tilapia or Nile tilapia: Which in the best culture fish? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES. 2. Piracicaba. *Anais...*Piracicaba: CBNA; 179-198.

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

MEURER. F, HAYASHI. C, BOSCOLO. R. W. 2003. Digestibilidade Aparente de Alguns Alimentos Protéicos pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32: 1801-1809.

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

NAGESWARA, P. V., BABU D. E. 2006. Probiotics as an alternative therapy to minimize or avoid antibiotics use in aquaculture. Fishing Chimes, 26: 112-114.

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

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 Farmaceuticas,* 38: 1-21.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. 2003. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono, 112p.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; PEDINI, M. 2000. Situação atual da aqüicultura brasileira e mundial. In: Valenti, W. C. 2000. Aqui no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/Mct, 353-381.

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

PEZZATO, L. E., BARROS, M. M., FRACALOSSI, D. M., CYRINO, J. E. P. 2004. Nutrição de peixes. *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva.* In: Cyrino, J. E. P. (Ed.) Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, TecArt, 2004, cap. 5, pp. 75-170.

PLANAS, M., CUNHA, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.

PROENÇA, C. E. M., BITTENCOURT, P. R. L. 1994. Manual de piscicultura tropical. Brasília: Ibama, 196 p.

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

SAHU, M. K., SWARNAKUMAR, N. S., SIVAKUMAR, K., THANGARADJOU, T., KANNAN, L. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48: 299-308.

SCHREZENMEIR, J., DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbyotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361-364.

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

SOUZA, M. E. 2007. *Caracterização genética de reprodutores de tilápia: estratégias para a manutenção da variabilidade.* Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Pesca e Aqüicultura.

STICKNEY, R. R. 2000. Status of research on tilápia. In: Costa- Pierce, B. A.; Rakocy, J. E. (Eds.) Tilapia aquaculture in the Americas. Louisiana: *World Aquaculture Society,* 2: 21-33.

SWEETEMAN, J., DIMITROGLOU, A., DAVIES, S., TORRECILLAS, S. 2008. Nutrient uptake: gut morphology a key to efficient nutrition. *International AquaFeed,* 11: 27-30.

TINH, N. T. N., DIERCKENS, K., SORGELOOS, P., BOSSIER, P., 2008. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*, 10: 1-12.

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.

VOLPATTI, L. D., ANGELO, L., JENEY, G., JENEY, Z., ANDERSON, D. P., GALEOTTI, M. 1998. Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *Journal of Applied Ichthyology*, 14: 201-206.

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

WATANABE, O. W., LOSORDO, T. M., FITZSIMMONS, K., HANLEY, F. 2002. Tilápia production systems in the Américas: technological advances, trends and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, 10: 465-498.

YASUI, G. S., SANTOS. L. C., SHIMODA, E., RIBEIRO-FILHO, O. P., CALADO, L. L., FREITAS, A. S., VIDAL JR, M. V., FERREIRA, E. B. 2007. Masculinização de três linhagens de tilápias do Nilo utilizando o andrógeno sintético 17-α-metil-testosterona. *Zootecnia Tropical*, 25: 307-310.

ZHOU, X., TIAN, Z., WANG, Y., LI, W. 2009. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish & Physiology Biochemistry*, 1742: 1573-1586.

ZIAEI-NEJAD, S., REZAEIB, M. H., TAKAMIC, G. A., LOVETTD, D. L., MIRVAGHEFIA, A., SHAKOURIE, 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.

ZIMMERMANN, S. 1999. Incubação artificial. Técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, 9: 15-21.
ZIMMERMANN, S. 2003.Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, 13: pp 69.
ZIMMERMANN, S., FITZSIMMONS, K. 2004. *Tilapicultura intensiva*. In: Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalosi, D. M., Castagnolli, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva, São Paulo: TecArt, Cap.9, 239-266.

5. APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Para facilitar a publicação dos resultados, após a incorporação das sugestões feitas pela banca, a dissertação será apresentada em dois capítulos na forma de manuscrito. Os capítulos seguiram as normas de publicação da revista internacional, *Aquaculture*, Amsterdam.

Capítulo 1 - **INCLUSÃO DE PROBIÓTICO NO PROCESSAMENTO DE RAÇÃO PARA JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO,** *Oreochromis niloticus***: DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E HISTOMORFOMETRIA DA PORÇÃO MÉDIA DO INTESTINO.**

Capítulo 2 - **INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICO NA DIETA PARA TILÁPIA DO NILO,** *Oreochromis niloticus***: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS.**

CAPÍTULO 1

INCLUSÃO DE PROBIÓTICO NO PROCESSAMENTO DE RAÇÃO PARA JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus*: **DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E HISTOMORFOMETRIA DA PORÇÃO MÉDIA DO INTESTINO**

RESUMO

Os probióticos são constituídos por microrganismos vivos que atuam beneficamente no hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal, favorecendo, a saúde dos animais. O objetivo foi avaliar a otimização do desempenho zootécnico e a caracterização histomorfométrica do intestino médio de jovens de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, variedade GIFT, alimentadas com probiótico, incluído antes e após o processamento de ração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco réplicas composto pelos seguintes tratamentos: ração peletizada sem probiótico; ração peletizada com inclusão do probiótico antes e após o processamento; ração extrusada sem probiótico e ração extrusada com inclusão do probiótico após o processamento. Duzentos e cinqüenta jovens foram distribuídos em 25 aquários (20L) e alimentados durante 63 dias. Foram constatadas diferenças para os valores médios do peso total no final do experimento. Após 42 dias de alimentação foram verificadas diferenças significativas na conversão alimentar para tratamentos com as dietas extrusadas comparadas com as peletizadas. Os peixes alimentados com as dietas suplementados com o probiótico apresentaram aumento na espessura da camada epitelial do intestino. O melhor desempenho zootécnico foi observado, na dieta extrusada suplementada de probiótico incorporado após o processamento de ração, e a inclusão de 4g kg^{-1} de probiótico, em dietas peletizadas e extrusadas, promoveu o aumento na espessura da camada epitelial do intestino médio.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyoi*, histologia, ciclídeo.

1. Introdução

Profissionais da iniciativa privada associados a instituições de ensino e de pesquisa anseiam pela viabilização de alimentos funcionais como os probióticos os quais são constituídos por microrganismos vivos que atuam beneficamente no hospedeiro, promovendo o equilíbrio na microbiota intestinal, favorecendo a saúde dos animais, definição mencionada por Fuller (1989).

Posteriormente, Verschuere et al., (2000) redefiniram probiótico para organismos aquáticos como "vida microbiana adjunta que tem efeito benéfico na associação, modificando a comunidade microbiana associada ou ambiente, garantindo melhor utilização do alimento para animais, através da resposta a doença".

Vários ensaios apresentam resultados promissores na criação de peixes, moluscos, crustáceos e anfíbios (Ringo e Gatesoupe, 1998; Verschuere et al., 2000; Irianto e Austin, 2002; Balcázar et al., 2006; Dias et al., 2008; Kesarcodi-Watson et al., 2008; El-Rhman et al., 2009; Zhou et al., 2009) possibilitando substituir os antibióticos na função de promotor de crescimento. Em peixes, são administrados em geral, por via oral para melhorar a flora microbiana do intestino (Nageswara e Babu, 2006; Sahu et al., 2008).

Os gêneros dos probióticos mais utilizados na criação de organismos aquáticos são as bactérias *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e leveduras *Saccharomyces* (Lara-Flores et al., 2003; Meurer et al., 2006 e 2008; Wang et al., 2008; Aly et al., 2008; Dias et al., 2008 e 2009; El-Rhman et al., 2009).

A tilápia do Nilo apresenta excelente potencial zootécnico e reprodutivo, estas características conferem o segundo lugar dos peixes mais cultivados em águas continentais no mundo, perdendo apenas para a carpa (Yasui et al., 2007).

No presente estudo foi utilizado *Bacillus toyoi* e *Bacillus subtilis* que tem como principal vantagem a capacidade de esporular, atribuindo maiores taxas sobrevivência durante o trânsito intestinal (Hoa et al., 2000).

Estudos feito por Sweetmam et al., (2008) afirmam que a função do trato intestinal e sua eficiência é fundamental para o sucesso comercial da produção de peixes, por meio de estudos histológicos estabelecendo o padrão e integridade estrutural.

O objetivo desse experimento foi avaliar as formas de inclusão de probiótico no processamento de ração, os parâmetros zootécnicos e a caracterização histomorfométrica do intestino de jovens de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* mantidas em condições laboratoriais.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca, APTA, S.A.A., São Paulo-SP, Brasil. Mil jovens de tilápias do Nilo, *O. niloticus* revertidos (lote 100% macho), pertencentes à variedade GIFT, foram acondicionados em dois tanques de 500L cada.

Após 15 dias de aclimatação, 250 peixes jovens, com medias de peso e comprimento total inicial de 5,23 ± 0,40 g e 6,90 ± 0,23 cm, foram selecionados e distribuídos aleatoriamente, em 25 aquários de 20L, providos de aeração contínua e sistema de filtragem individual.

Os parâmetros de qualidade da água temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica, sólidos dissolvidos totais e amônia foram monitorados semanalmente, com auxílio do medidor de multiparâmetros.

Estabeleceu-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e cinco réplicas totalizando 25 parcelas, e a unidade experimental composta de 10 peixes.

Quatro gramas do probiótico PAS TR® (*Bacillus toyoi* 4,0 x 10^8 UFC g^{-1} e *Bacillus subtilis* 4,0 x 10^8 UFC g^{-1}) foram adicionados à dieta durante o processo de peletização, e com veículo oleoso (2% óleo de soja) após o processamento (peletização e extrusão).

A composição basal detalhada para jovens de tilápias do Nilo encontra-se na Tabela 1. As rações foram formuladas com base nos dados apresentados no NRC (1993). Os tratamentos obedeceram ao desenho experimental mostrado na Tabela 2.

Os peixes foram alimentados com dietas experimentais formuladas peletizada e extrusada com 36% de proteína bruta (PB), três vezes ao dia (Kubitza, 1999), às 08h, 14h e 18h, na proporção de 1% do peso vivo, por 63 dias e biometrias a cada três semanas.

Tabela 1

Composição química e análise centesimal da ração basal.

Ingredientes (%)	Dieta Basal	
	Sem Probiótico	Com Probiótico
Farelo de Soja	45.10	45.10
Farelo de Trigo	21.24	21.24
Fubá de Milho	10.45	10.05
Farinha de Peixe	10.00	10.00
Glúten de Milho	4.00	4.00
Fosfato Bicálcico	3.80	3.80
Premix Vitamínico e Mineral	0.50	0.50
L – Lisina	0.40	0.40
DL – Metionina	0.41	0.41
Vitamina C	0.08	0.08
BHT	0.02	0.02
Probiótico	0.00	0.40
Total	100.00	100.00

Foi adicionado fubá de milho na dieta que não recebeu suplementação do probiótico

Tabela 2

Tratamentos utilizados durante a realização do experimento.

Tratamentos	Processamento		Adição Probiótico	Adição óleo
T1	Peletizada controle	-	-	4g kg^{-1}
T2	Peletizada	Antes	4g kg^{-1}	4g kg^{-1}
T3	Peletizada	Após	4g kg^{-1}	4g kg^{-1}
T4	Extrusada controle	-	-	4g kg^{-1}
T5	Extrusada	Após	4g kg^{-1}	4g kg^{-1}

A Tabela 3 mostra as análises bromatológicas realizadas no Laboratório de Nutrição Animal/LANA da UNESP - Jaboticabal, SP, segundo a AOAC, (1990).

Para as análises foram feitos os seguintes procedimentos: Matéria Seca (MS) a pré-secagem - 65°C/72h e secagem em estufa - 105°C/24h até peso constante; Extrato Etéreo (EE) lavagem da amostra com solvente (éter) - Soxhlet; Fibra Bruta (FB) tratamento da amostra com solução ácida e em

seguida de solução básica; Proteína Bruta (PB) nitrogênio total da amostra método de Kjeldahl; Matéria Mineral (MM) incineração da amostra - 600°C/4h e Energia Bruta (EB) através de bomba calorimétrica.

Tabela 3

Resultados das análises da composição químico bromatológica das dietas durante o experimento

Matéria Seca (%)	86.52
Proteína Bruta (%)	36.00
Extrato Etéreo (%)	4.58
Fibra Bruta (%)	8.43
Matéria Mineral (%)	13.48
Energia Bruta (kg cal^{-1})	3524.00

2.1. Parâmetros zootécnicos

Os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína 100mg L^{-1} conforme os princípios éticos de manipulação animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), pesados e medidos, para a determinação dos seguintes parâmetros zootécnicos, a cada de 21 dias: Peso (P) = Peso total; Comprimento (C) = Comprimento total; Consumo Diário de Ração (CD) = Consumo final - Consumo inicial/ nº de dias; Ganho em peso (GP) = Peso final - Peso Inicial; Conversão Alimentar Aparente (CAA) = Consumo de ração/ Ganho em peso; Sobrevivência (S) = 100 * (nº inicial de peixes - nº final de peixes)/ nº inicial de peixes.

2.2. Parâmetros Histológicos

Com objetivo de analisar a estrutura histomorfométrica do intestino foi utilizado um exemplar de cada repetição perfazendo um total de cinco jovens de tilápias do Nilo por tratamento. Os peixes foram anestesiados, eutanasiados por aprofundamento anestésico seguido de dissecção medular e submetidos a uma incisão longitudinal no ventre para a exposição do órgão.

Fragmentos da porção média dos intestinos foram removidos, com materiais cirúrgicos esterilizados e fixados em solução de formalina tamponada a 10%, por 48 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para álcool 70% G.L., permanecendo assim conservadas até o momento da inclusão.

No Laboratório de Endocrinologia de Peixes, USP, os fragmentos foram submetidos à desidratação gradual em série alcoólica crescente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Dos blocos obtidos, foram realizados cortes de 5,0 µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas, coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) (Maia, 1979) e analisadas em microscópio de luz.

Para determinar a altura do epitélio intestinal foram medidas as vilosidades de acordo com as características estruturais. Assim, foram selecionadas duas vilosidades por secção histológica em 75 lâminas e realizadas 30 medições por tratamento. As imagens foram obtidas em câmera digital acoplada à fotomicroscópio e analisadas pelo programa Image J (40X).

2.3. Análises estatísticas

Para verificar os resultados dos parâmetros zootécnicos, histomorfométricos do intestino e da qualidade de água nos diferentes tratamentos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bartlett's para verificar a homogeneidade dos dados e, o teste de Tukey para constatar diferenças entre os tratamentos. Os resultados foram considerados significativos quando $P<0.05$ (Zar, 2009).

3. Resultados e Discussão

3.1. Qualidade da água

As médias e desvios padrão dos valores dos parâmetros da qualidade da água durante o período experimental foram: temperatura = 27.56 ± 0.54 °C; pH = 7.81 ± 0.41; oxigênio dissolvido = 5.10 ± 0.39 mg L^{-1}; condutividade elétrica = 484.27 ± 123.21 µS cm^{-1} e sólidos totais em dispersão = 255.27 ± 104.60 ppm. Estes parâmetros não apresentaram diferenças significativas indicando que a qualidade da água permaneceu constante durante os 63 dias, e encontram-se dentro da faixa de conforto recomendada para peixes (Sipaúba-Tavares, 1995).

Os teores de amônia (NH_3) foram mantidos em níveis ≤ 1.0 ppm devido à renovação constante de água, filtragem biológica, segundo Kubitza (2003). O sifonamento do fundo dos aquários e a renovação de água impediram o acúmulo de matéria orgânica, garantindo a manutenção da qualidade da água.

3.2. Desempenho Zootécnico

Os índices de desempenho zootécnico dos jovens de tilápias do Nilo estão apresentados na Tabela 3.

No presente trabalho, aos 21 dias, as médias de peso e comprimento totais dos jovens mostraram-se uniformes, não apresentando diferenças entre os tratamentos ($P<0.05$). A partir do 42º dia de arraçoamento, os peixes submetidos ao tratamento de dietas extrusadas sem e com probiótico (T4 e T5) apresentaram valores médios de peso e comprimento significativamente superiores em relação ao tratamento de dietas peletizadas (T1, T2 e T3). Baccarin e Pezzato, (2001) e Castro e Cervon, (2004) trabalhando com alevinos e jovens de tilápias do Nilo, alimentadas com dietas suplementadas com leveduras *Saccharomyces cerevisiae,* mostraram incremento nos valores do peso. Com esses resultados pode-se afirmar que o produto teve efeito e, consequentemente, os peixes tiveram desenvolvimento superior aos demais tratamentos, indicando que o uso de probiótico é benéfico na produção da espécie.

Em relação às médias de consumo diário dos tipos de ração, peletizada e extrusada, os tratamentos T1 e T3 mostraram significantemente menores em relação aos outros no 21º dia. Não foram observadas diferenças entre os demais tratamentos ($P<0.05$). No 42º dias pode-se notar que nos tratamentos T1 e T4 o consumo diário foi maior quando comparado aos peixes alimentados com as demais dietas. Os resultados apresentados por Rodrigues e Fernandes (2006) diferem deste estudo, pois, avaliaram diferentes processamentos de ração para o acará-bandeira, *Pterophilum scalare* onde as médias de consumo foram superiores em peixes alimentados com a dieta extrusada.

Pezzato et al., (2002), avaliando o processamento de dietas para tilápias do Nilo, observaram melhor conversão alimentar e desempenho produtivo nos peixes que receberam ração extrusada quando comparado à peletizada. Pois,

segundo Andrigueto et al., (1981) a extrusão da ração aumenta a eficiência alimentar do peixe e melhora a palatabilidade dos ingredientes, proporcionando o desempenho satisfatório dos animais. Embora os resultados sejam diferentes dos encontrados na literatura fica comprovado que a utilização do produto é favorável a criação de organismos aquáticos.

A partir do 42º dias de experimento, para o ganho em peso, os dados foram semelhantes aos encontrados por Meurer et al., (2006) os quais não constataram incremento do mesmo parâmetro para tilápias alimentadas durante 30 dias com *Saccharomyces cerevisiae*. O mesmo foi descrito por Suzer et al., (2008) em larvas de dourada, *Sparus aurata* alimentados com *Lactobacillus ssp*. Já Lara-Flores et al., (2003), e Wang et al., (2008), ressaltaram melhora do desempenho zootécnico em estudos com tilápias em diferentes modos de aplicação do probiótico, na ração e água, respectivamente. No presente estudo o produto não influenciou o ganho em peso.

Os valores médios das taxas de sobrevivência não mostraram diferenças significativas entre as biometrias, variando entre 80 e 100%. Dados semelhantes foram descritos por Meurer et al., (2006), em investigações realizadas com a inclusão de leveduras vivas, mostrando que não houve influência nas larvas de tilápias do Nilo, assim como, os reportados por Makridis et al., (2000), que observaram diferenças nas taxas de sobrevivência na adição de duas cepas de bactérias na dieta durante a larvicultura de *Scophthalmus maximus*. No entanto, diferiram dos valores apresentados por Carnevali et al., (2004) para a sobrevivência de larvas de *Sparus aurata*, onde verificaram efeito positivo da adição de probióticos, em um consórcio entre *Lactobacillus plantarum e L. fructivorans*. Com esses índices elevados pode-se afirmar que, o produto foi eficiente nas condições realizadas no presente experimento.

Tabela 3

Parâmetros de desempenho zootécnico de jovens de tilápias do Nilo após 21, 42 e 63 dias (n=10 por tratamento).

Tratamentos	P (g)	C (cm)	CD (g)	GP (g)	CAA	S (%)
			Biometria aos 21 dias			
T1	9.00 ± 1.80 [a]	8.12 ± 0.60 [a]	3.57 ± 0.35 [a]	2.17 ± 0.27 [a]	1.65 ± 0.06 [a]	94.00 ± 6.00 [a]
T2	8.82 ± 2.14 [a]	8.03 ± 0.61 [a]	2.98 ± 0.18 [ab]	1.81 ± 0.09 [abc]	1.65 ± 0.02 [a]	86.00 ± 14.00 [a]
T3	9.10 ± 1.60 [a]	8.21 ± 0.53 [a]	3.43 ± 0.14 [a]	2.10 ± 0.11 [abc]	1.64 ± 0.04 [a]	96.00 ± 4.00 [a]
T4	9.97 ± 2.49 [a]	8.50 ± 0.66 [a]	2.79 ± 0.48 [ab]	1.74 ± 0.29 [bc]	1.60 ± 0.05 [a]	80.00 ± 20.00 [a]
T5	10.00 ± 2.85 [a]	8.46 ± 0.77 [a]	2.63 ± 0.70 [b]	1.66 ± 0.47 [c]	1.59 ± 0.05 [a]	84.00 ± 16.00 [a]
			Biometria aos 42 dias			
T1	14.22 ± 3.68 [a]	9.60 ± 0.84 [a]	3.60 ± 0.21 [a]	2.37 ± 0.16 [a]	1.52 ± 0.03 [ab]	97.78 ± 2.22 [a]
T2	12.10 ± 4.80 [a]	9.03 ± 1.14 [a]	3.09 ± 0.52 [a]	1.98 ± 0.34 [a]	1.53 ± 0.04 [ab]	90.00 ± 10.00 [a]
T3	14.64 ± 4.15 [a]	9.44 ± 0.83 [a]	3.54 ± 0.34 [a]	2.34 ± 0.22 [a]	1.51 ± 0.03 [ab]	92.78 ± 7.22 [a]
T4	17.10 ± 5.01 [b]	10.10 ± 1.04 [a]	3.40 ± 1.18 [a]	2.29 ± 0.80 [a]	1.48 ± 0.03 [b]	91.11 ± 8.89 [a]
T5	18.20 ± 7.49 [b]	10.24 ± 1.19 [a]	3.25 ± 1.19 [a]	2.23 ± 0.85 [a]	1.47 ± 0.06 [b]	79.56 ± 20.44 [a]
			Biometria aos 63 dias			
T1	18.50 ± 6.54 [a]	10.16 ± 1.10 [a]	3.21 ± 0.16 [a]	2.23 ± 0.10 [a]	1.43 ± 0.02 [ab]	100.00 ± 0.00 [a]
T2	15.66 ± 6.00 [a]	9.55 ± 1.14 [a]	2.43 ± 0.67 [a]	1.68 ± 0.48 [a]	1.45 ± 0.04 [ab]	97.14 ± 6.39 [a]
T3	19.19 ± 6.10 [a]	10.11 ± 1.10 [a]	2.84 ± 0.14 [a]	1.98 ± 0.10 [a]	1.43 ± 0.02 [ab]	97.14 ± 6.39 [a]
T4	23.46 ± 8.92 [b]	10.79 ± 1.22 [a]	3.37 ± 0.81 [a]	2.42 ± 0.59 [a]	1.40 ± 0.02 [bc]	100.00 ± 0.00 [a]
T5	25.60 ± 8.37 [b]	11.26 ± 1.37 [a]	3.12 ± 1.47 [a]	2.29 ± 1.10 [a]	1.37 ± 0.03 [c]	97.14 ± 6.39 [a]

[abc] Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente por Tukey (P<0.05)

Peso total (P); Comprimento total (C); Consumo Diário (CD); Ganho em peso (GP); Conversão Alimentar Aparente (CAA) e Sobrevivência (S).

3.3. Histomorfometria da porção média do intestino do trato intestinal

Neste estudo verificou-se que os tratamentos controle não apresentaram diferenças significativas (P<0,05) quando comparadas entre si (Tabela 4).

Tabela 4

Espessura média ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da camada epitelial (µm) da porção média do intestino de juvenis de tilápias do Nilo após 21, 42 e 63 dias.

Tratamentos	Biometrias (dias)		
	21º	42º	63º
T1	26,92 ± 3,44 [a]	28,55 ± 2,77 [a]	27,91 ± 2,89 [a]
T2	31,66 ± 4,33 [b]	32,04 ± 3,32 [b]	31,36 ± 4,71 [b]
T3	32,01 ± 4,54 [b]	31,53 ± 4,09 [b]	32,63 ± 4,17 [b]
T4	26,37 ± 3,17 [a]	28,56 ± 3,01[a]	27,43 ± 3,36 [a]
T5	32,09 ± 3,76 [b]	32,69 ± 3,50 [b]	32,94 ± 3,37 [b]
S/ probiótico[1]	26,64 ± 3,29 [a]	28,55 ± 2,87 [a]	27,67 ± 3,11 [a]
C/ probiótico[2]	31,92 ± 4,21 [b]	32,09 ± 3,64 [b]	32,28 ± 4,14 [b]

[1] Agrupamento dos tratamentos sem probiótico na dieta

[2] Agrupamento dos tratamentos com adição de probiótico

Letras diferentes diferem-se entre si na coluna por Tukey (P< 0,05)

A figura 1 representa os cortes transversais onde podem ser identificadas as vilosidades do intestino dos peixes alimentadas com dietas suplementadas com probiótico ou não.

Os peixes alimentados com probiótico (T2, T3 e T5) mostraram diferenças significativas na altura da camada epitelial das vilosidades da porção média do intestino comparadas aos tratamentos controles (Tabela 4). Tal fato mostra que o probiótico promoveu o aumento da camada epitelial do intestino médio desses peixes, coincidindo com os estudos descritos por Medri et al., (1999) para a mesma espécie, porém, alimentadas com levedura. Estas mesmas observações foram confirmadas por Silva et al., (2005), e Cardoso (2005) em saguiru, *Steindachnerina notonota* e peixes antárticos, *Notothenia rossii*, respectivamente.

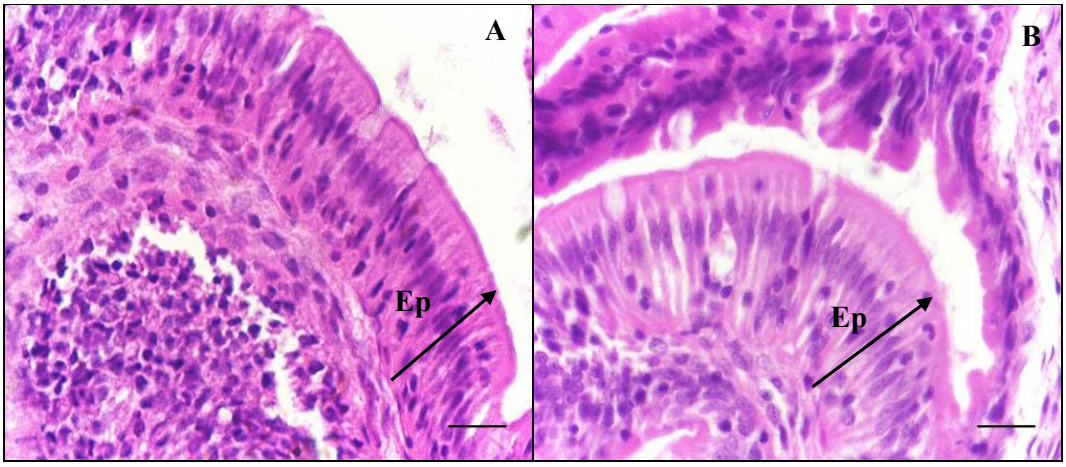


Figura 1. Fotomicrografias da camada epitelial das vilosidades da porção média do intestino de jovens de tilápias do Nilo: (A) Tratamento controle; (B) Tratamento suplementado com probiótico; (Ep) Epitélio; (→) Espessura. (Barra=10μm). Coloração: HE.

Os resultados do presente trabalho assemelham-se aos encontrados por Fabregat et al., (2008) com tilápias do Nilo alimentadas com Flavofeed®, que também avaliaram a altura das vilosidades do intestino e, mais recentemente, para a mesma espécie, onde Sousa (2010) identificou alterações benéficas nas vilosidades intestinais utilizando o β-glucano na proporção de 0,03% no período de 90 dias. Segundo Hisano et al., (2006), estudando leveduras íntegras e seus derivados, observaram que as mudanças morfológicas intestinais ocorreram devido ao maior teor de mananoligossacarídeo (MOS) e nucleotídeos presentes na dieta, influenciando o trato intestinal e sua microbiota. Ressalta-se que as alterações mostram um caráter benéfico sobre as características morfológicas do trato intestinal, promovendo o aumento na área de absorção da mucosa de tilápias do Nilo alimentadas com dieta suplementada com MOS.

Truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, alimentadas com dietas suplementadas com Bio-mos® apresentaram também aumento na altura e espessura das vilosidades intestinais (Staykov et al., 2007). O mesmo foi registrado quando alimentadas com proteína de soja, nutriente vegetal rico em polissacarídeos estruturais (Escaffre et al., 2007).

Burrells et al., (2001) estudando salmão do Atlântico *Salmo salar*, ressaltaram as respostas morfológicas diferenciadas nos intestinos de peixes alimentados com dietas suplementadas com nucleotídeos. Os autores relataram que a média do comprimento da porção proximal, mediana e distal

do intestino, assim como a superfície total do intestino, foram estatisticamente superiores aos que receberam a ração controle.

Salinas et al., (2008) estudando a suplementação de *Lactobacillus delbrueckii* e Ringo et al., (2010) com bactérias ácido láticas, avaliaram o efeito de probióticos no epitélio intestinal dos salmonídeos. Merrifield et al., (2010) mostraram melhoras na morfologia intestinal das microvilosidades dos salmonídeos quando alimentados com probióticos e Sweeteman et al., (2008) afirmaram que as interações entre a microflora intestinal, morfologia do intestino, sistema imune e a absorção de nutrientes podem influenciar na saúde e performance dos peixes.

4. Conclusões

A inclusão de 4g kg^{-1} de probiótico, em dietas peletizadas e extrusadas, promoveu o aumento na espessura da camada epitelial do intestino médio em jovens de tilápia. O melhor desempenho zootécnico foi observado na dieta extrusada suplementada de probiótico incorporado após o processamento de ração.

5. Agradecimentos

O primeiro autor é grato a FAPESP (processo n^{o} 2009/01530-8). Os autores agradecem ao técnico de laboratório do ICB-USP, SP, *Cruz Alberto Mendoza Rigonati*; ao docente *Renato Lamounier Barbieri*; a *Empresa IMEVE Biotecnologia – Indústria de Medicamentos Veterinários Ltda;* a *Empresa Fri-ribe S/A*; a *Universidade Federal de São Carlos* – UFSCar e ao *Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP*, Jaboticabal, SP.

6. Referências bibliográficas

Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., Mohamed, M. F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus,* as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunology, 25: 128-136.

Andriguetto, J. M., Perly, L., Minardi, I., Gemael, A., Flemming, J. S., Bona-Filho, A. 1981. Nutrição animal. As bases e os fundamentos da nutrição animal - os alimentos. 4ªed. São Paulo: Nobel, 1: 365p.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists .1990. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington: AOAC, p.1298.

Baccarin, A. E., Pezzato, L. E. 2001. Efeito da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia do Nilo**.** Pesquisa Agropecuária Brasília, 36: 549-556.

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.

Burrells, C., Williams, P. D. Southgate, P. J., Wadsworth, S. L. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 199: 171-184.

Cardoso, W. E. 2005. Morfologia e ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossii* Richardson, 1844 e sua relação com o hábito alimentar. 115p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná – UFPR. Disponível em http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4646/1/Microsoft%20Word%20-%20TESE_completa.pdf, acesso em 13/07/2009.

Carnevali, O., Zamponi, M. C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A. M., Cresci, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. Aquaculture International, 12: 377-386.

Castro, C. A. S., Cervon, M. F. 2004. Efecto del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) al ser proposto como promotor de crescimento. Redvet, 4: 1-13.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: htpp://www.cobea.org.br. Consultado em março de 2010.

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., Stéfani, M. V., Ferreira, C. M., França, F. M., Ranzani-Paiva, M. J. T., Santos, A. A. 2009. Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. Aquaculture Research, 40:1-8.

El-Rhman, A. M. A, Khattab, Y. A. E, Shalaby, A. M. E. 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.

Escaffre, E. F. Kaushik, S. Mambrini, M. 2007. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. Aquaculture, 273: 127-138.

Fabregat, T. E. H. P., Fernandes, J. B. K., Rodrigues, L. A., Cabral, K. G., Garcia, F., Sakomura, N. K. 2008. Prebiótico Flavofeed® como suplemento dietético para juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: Cyrino, J. E. P., Scorvo, J. D., Sampaio, L. A., Cavalli, R. O. (Org.). Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura II. 1ª ed. Piracicaba-SP: Copiadora Luiz de Queiroz, 95-104.

Fuller, R. 1989. A review: probiotic in man and animals. Journal Applied Environmental Microbiology, 63: 1034-1039.

Hisano, H., Silva, M. D. P., Barros, M. M., Pezzato, L. E. 2006. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. Acta Scientiarum, 28: 311-318.

Hoa, N. T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P. H., Ammendola, S., Ricca, E., Cutting, S. M. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Applied and Environmental Microbiology, 66: 5241-5247.

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

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: 1-14.

Kubitza, F. 1999. Nutrição e alimentação dos peixes cultivados. 3ªed. Jundiaí: Kubitza, F. pp.123.

Kubitza, F. 2003. Qualidade da água no cultivo de camarões e peixes. Jundiaí: CIP – USP Editora. pp.228.

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.

Maia, V. 1979 Técnica Histológica. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 70-136.

Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J., Vadstein, O. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or biencapusated in rotifers. Aquaculture International, 6: 367-380.

Medri, V., Pereira, G. V., Leonhardt, J. H., Panini, M. S., Dietzel, S. 1999. Avaliação sensorial de filés de tilápias alimentadas com diferentes níveis de levedura alcooleira. Acta Scientiarum, 21: 303-308.

Merrifield, D. L., Harper, G., Baker, R. T. M., Ringo, 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, 302: 1-18.

Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M. M., Mauerwerk, V. L., Freccia, A. 2006. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. Revista Brasileira de Zootecnia, 35: 1881-1886.

Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M. M., Mascioli, A. S., Colpini, L. M. S., Freccia, A. 2008. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 9: 804-812.

Nageswara, P. V., Babu D. E. 2006. Probiotics as an alternative therapy to minimize or avoid antibiotics use in aquaculture. Fishing Chimes, 26: 112-114.

National Research Council (NRC), 1993. Nutrient requirements of warm water, fishes and shellfishes: Nutrient requirements of domestic animals. Washington. pp.125.

Pezzato, L. E., Miranda, E. C., Furuya, W. M., Pinto, G. Q., Barros, M. M., Magalhães, G. J. 2002. Diâmetro do ingrediente e a digestibilidade aparente de rações de duas espécies de peixes tropicais. Animal Science, 4: 901-907.

Pezzato, L. E., Barros, M. M., Fracalossi, D. M., Cyrino, J. E. P. 2004. Nutrição de peixes. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. In: Cyrino, J. E. P. (Ed.) Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, TecArt, 2004, cap. 5, pp. 75-170.

Ringo, E., Gatesoupe, F., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160: 177–203.

Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R. E., Mayhew, T. M., 2010. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. Aquaculture Research, 41: 451-467.

Rodrígues, L. A.; Fernandes, J. B. K. 2006. Influência do processamento da dieta no desempenho produtivo do acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*). Acta Scientiarium, 28: 113-119.

Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. Indian Journal of Microbiology, 48: 299-308.

Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M. A., Olsen, R. E., Meseguer, J., Ringo, E., 2008. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida epithelial damage. Veterinary Microbiology, 128: 167-177.

Silva, N. B., Gurgel, H. C. B., Santana, M. C. 2005. Histologia do Sistema Digestório de Sagüiru, *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro, 1937) (Pisces, Curimatidae) do Rio Ceará Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, 31: 1-8.

Sipaúba-Tavares, L. H. 1995. Limnologia Aplicada a Aqüicultura. Jaboticabal: FUNEP. pp.70.

Sousa, A. D. L. 2010. Mananoligossacarídeo e β-glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápias do Nilo mantidas em tanques-rede. 52 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista – Centro de Aquicultura. Disponível em http://www.caunesp.unesp.br/Publicacoes/Dissertacoes_Teses/Teses/Tese%20Andressa%20Daniela%20Liranco%20de%20Sousa.pdf, acesso em 23/05/2010.

Staykov, Y., Spring, P., Denev; S., Sweetman, J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture International**,** 15: 153-161.

Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, A., Firat, K., Otgucuoðlu, Ö., Küçüksari, H. 2008. *Lactobacillus spp*. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities, Aquaculture, 280: 140-145.

Sweeteman, J., Dimitroglou, A., Davies, S., Torrecillas, S. 2008. Nutrient uptake: gut morphology a key to efficient nutrition. International AquaFeed, 11: 27-30.

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.

Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T., Li, W.F 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture, 277: 203–207.

Yasui, G. S., Santos. L. C., Shimoda, E., Ribeiro-Filho, O. P., Calado, L. L., Freitas, A. S., Vidal Jr, M. V., Ferreira, E. B. 2007. Masculinização de três linhagens de tilápias do Nilo utilizando o andrógeno sintético 17-α-metil-testosterona. Zootecnia Tropical, 25: 307-310.

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

Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., Li, W. 2009. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology Biochemistry, 1742: 1573-1586.

7. Apêndices

Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca

Jovens de Tilápias do Nilo e Ração Basal

Processamento de Peletização e de Extrusão

Continuação do apêndice

Incorporação do Probiótico

Incorporação do Óleo

Biometria em Peso e Comprimento

Continuação do apêndice

Retirada do Fragmento do Intestino para Histologia

Microfotografias dos Cortes Histológicos

CAPÍTULO 2

INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICO NA DIETA PARA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus*: **PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS**

Resumo

Os probióticos constituídos por microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do peixe e deve ser capaz de colonizar, estabelecer e se multiplicar no intestino do hospedeiro. A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* - variedade Gift é um ciclídeo que apresenta excelente potencial zootécnico e reprodutivo, atrai a atenção dos piscicultores por ser uma espécie consolidada nas atividades dos agronegócios. Objetivou-se estimar os parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos em dietas de jovens, alimentados com probiótico, incluído antes e após o processamento de peletização e extrusão da ração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco réplicas composto pelos seguintes tratamentos: ração peletizada sem probiótico, ração peletizada com inclusão do probiótico antes e após o processamento, ração extrusada sem probiótico e ração extrusada com inclusão do probiótico após o processamento. Duzentos e cinqüenta jovens foram distribuídos em 25 aquários (20L) e alimentados durante 63 dias. Os parâmetros hematológicos não sofreram a ação do produto não apresentando diferenças significativas durante o período experimental. A capacidade fagocítica dos animais que receberam a dieta extrusada suplementada com probiótico foi significativamente superior quando comparado aos demais tratamentos, entretanto, para o índice fagocítico não ocorreu diferenças entre os tratamentos. Os jovens alimentados com a dieta extrusada mostraram melhora na imunidade inespecífica. As bactérias probióticas colonizaram o intestino, pois foi possível recuperá-las. Pode-se afirmar que esses peixes mantiveram-se sadios, pois os parâmetros hematológicos não sofreram alterações durante o período experimental.

Palavras–chave: *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyoi*, ciclídeo, *migração de macrófagos*

1. Introdução

Os probióticos foram definidos por Fuller (1989), como "microrganismo vivo suplementado na dieta o qual beneficia o animal hospedeiro por melhorar o balanço microbiano intestinal". Em outubro de 2001, a FAO/OMS, intitulou o termo probiótico como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro".

Recentemente, Nayak (2010) afirma que um probiótico ideal, independente da fonte, deve ser capaz de colonizar, estabelecer e multiplicar no intestino do hospedeiro.

Os produtos mais utilizados na indústria da aquicultura incluem uma vasta gama como, as bactérias Gram positivas especialmente bactérias ácido láticas, *Bacillus*, *Streptococcus spp*, as bactérias Gram negativas *Aeromonas*, *Alteromonas*, bifidobactérias, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e as leveduras *Saccharomyces*, *Debaryomyces* (Irianto e Austin, 2002; Burr et al., 2005; Sahu et al., 2008; Kesarcodi-Watson et al., 2008), dentre outros. Em peixes são administrados oralmente e a suplementação é feita em geral, nas rações (Nageswara e Babu 2006; Sahu et al., 2008).

Os efeitos benéficos incluem competição por sítios de adesão e resistência à colonização; competição por nutrientes essenciais; produção de compostos antagonistas contra-patógenos; melhora da resposta imune e resistência à doenças; melhoria da digestibilidade na alimentação e desempenho produtivo (Ringo e Gatesoupe, 1998; Verschuere et al., 2000; Balcázar et al., 2006; Dias et al., 2008; Kesarcodi-Watson et al., 2008).

A manipulação da microbiota intestinal através da suplementação dietética é uma nova abordagem não só do ponto de vista nutricional, mas também, como uma modalidade terapêutica alternativa viável para superar os efeitos adversos dos antibióticos e drogas (Cross, 2002).

A estimulação do sistema imune pela utilização de cepas probióticas foi reportada por Gill et al., (2000); Rengpipat et al., (2000); Selvin et al., (2004) e Gullian et al., (2004) como uma característica a ser considerada na seleção de bactérias. A imunoestimulação é uma alternativa para manter o sistema de defesa ativo, aumentando a resistência a vírus, ou controlando populações bacterianas patogênicas que podem afetar a saúde do hospedeiro.

Testes de ativação e incremento da imunidade inespecífica amplificam em organismos aquáticos a migração dos macrófagos até a cavidade celomática, e estimam a capacidade e o índice fagocítico dos macrófagos (Silva et al., 2002; 2005), técnica essa que permite avaliar a resposta imune inespecífica, através da observação do macrófago ativo ou não, por meio da contagem das leveduras fagocitadas.

O objetivo foi verificar se a adição do probiótico proporcionou alterações nos parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos do intestino de jovens de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, quando mantidas em condições laboratoriais.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca, APTA, S.A.A., São Paulo-SP, Brasil. Mil jovens de tilápias do Nilo, *O. niloticus* revertidos (lote 100% macho), pertencentes à variedade GIFT, foram acondicionados em dois tanques de 500L cada.

Após 15 dias de aclimatação, 250 peixes jovens, com peso e comprimento inicial de 5,23 ± 0,40 g e 6,90 ± 0,23 cm, foram selecionados e distribuídos aleatoriamente, em 25 aquários de 20L, providos de aeração contínua e sistema de filtragem individual.

Os parâmetros de qualidade da água temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica, sólidos dissolvidos totais e amônia foram monitorados, semanalmente, com auxílio do medidor de multiparâmetros.

Estabeleceu-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e cinco réplicas totalizando 25 parcelas, e a unidade experimental composta de 10 peixes.

Quatro gramas do probiótico PAS TR® (*Bacillus toyoi* 4,0 x 10^8 UFC g^{-1} e *Bacillus subtilis* 4,0 x 10^8 UFC g^{-1}) foram adicionados à dieta durante o processo de peletização, e com veículo oleoso (2% óleo de soja) após o processamento (peletização e extrusão).

A composição basal detalhada para os jovens de tilápias do Nilo encontra-se na Tabela 1. As rações foram formuladas com base nos dados

apresentados no NRC (1993). Os tratamentos obedeceram ao desenho experimental mostrado na Tabela 2.

Os peixes foram alimentados com dietas experimentais formuladas peletizada e extrusada com 36% de proteína bruta (PB), três vezes ao dia (Kubitza, 1999), às 08h, 14h e 18h, na proporção de 1% do peso vivo, por 63 dias e biometrias a cada três semanas.

Tabela 1

Composição química e análise centesimal da ração basal.

Ingredientes (%)	Dieta Basal	
	Sem Probiótico	Com Probiótico
Farelo de Soja	45,10	45,10
Farelo de Trigo	21,24	21,24
Fubá de Milho	10,45	10,05
Farinha de Peixe	10,00	10,00
Glúten de Milho	4,00	4,00
Fosfato Bicálcico	3,80	3,80
Premix Vitamínico e Mineral	0,50	0,50
L – Lisina	0,40	0,40
DL – Metionina	0,41	0,41
Vitamina C	0,08	0,08
BHT	0,02	0,02
Probiótico	0,00	0,40
Total	100,00	100,00

Foi adicionado fubá de milho na dieta que não recebeu suplementação do probiótico

Tabela 2

Tratamentos utilizados durante a realização do experimento.

Tratamentos	Processamento		Adição Probiótico	Adição óleo
T1	Peletizada controle	-	-	4g kg^{-1}
T2	Peletizada	Antes	4g kg^{-1}	4g kg^{-1}
T3	Peletizada	Após	4g kg^{-1}	4g kg^{-1}
T4	Extrusada controle	-	-	4g kg^{-1}
T5	Extrusada	Após	4g kg^{-1}	4g kg^{-1}

A Tabela 3 mostra as análises bromatológicas realizadas no Laboratório de Nutrição Animal/LANA da UNESP - Jaboticabal, SP, segundo a AOAC, (1990).

Para as análises foram feitos os seguintes procedimentos: Matéria Seca (MS) a pré-secagem - 65°C/72h e secagem em estufa - 105°C/24h até peso constante; Extrato Etéreo (EE) lavagem da amostra com solvente (éter) – Soxhlet; Fibra Bruta (FB) tratamento da amostra com solução ácida e em seguida de solução básica; Proteína Bruta (PB) nitrogênio total da amostra método de Kjeldahl; Matéria Mineral (MM) incineração da amostra - 600°C/4h e Energia Bruta (EB) através de bomba calorimétrica.

Tabela 3

Resultados das análises da composição químico bromatológica das dietas.

Matéria Seca (%)	86,52
Proteína Bruta (%)	36,00
Extrato Etéreo (%)	4,58
Fibra Bruta (%)	8,43
Matéria Mineral (%)	13,48
Energia Bruta ($Kg.cal^{-1}$)	3524,00

2.1. Análises hematológicas

Para as avaliações hematológicas, a cada 21 dias foram coletadas amostras de sangue de 10 peixes por tratamento, anestesiados individualmente, em solução aquosa de benzocaína 1g $10L^{-1}$ até a perda do equilíbrio e, redução dos movimentos operculares (Matushima e Mariano, 1996, Delbon, 2006).

Coletou-se sangue, por meio de punção da veia caudal com seringas heparinizadas, e confeccionaram-se extensões sanguíneas, posteriormente coradas por May-Grünwald-Giemsa, segundo método de Rosenfeld (1947) para realizar a contagem total e diferencial de leucócitos e de trombócitos (Hrube e Smith, 1998).

Determinou-se o número total de eritrócitos (RBC), por meio de contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se diluente de Hayen; o porcentual de hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito, e a taxa de hemoglobina

(Hb), através do método da cianometahemoglobina. Com os resultados obtidos, calcularam-se os índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

2.2. Imunologia

Ao final do experimento, um animal de cada repetição, num total de cinco peixes de cada tratamento, foi utilizado para realizar os testes imunológicos. Injetou-se 1 mL de solução contendo leveduras, *Sacharomyces cerevisiae* na concentração de 8.000 células mm^{-3} na cavidade celomática. Após o período de 4h de incubação, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (1g L^{-1}) e, eutanasiados por secção da medula espinhal (porção cervical). Foi feito um corte ventral, por onde foi realizado o lavado da cavidade peritoneal com 1 mL de solução salina a 0,07%. O líquido contendo as células fagocíticas (macrófagos) foi aspirado com pipeta Pasteur e centrifugado a 1500 rpm (251.5 x g) por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o estante depositado entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio de contraste de fase (400 X) para contagem do número de fagócitos (Tachibana et al., 2010). Com o número de macrófagos e o total de leveduras no interior das células fagocíticas foram calculados os valores de Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) segundo metodologia preconizada por Silva et al., (2002, 2005): CF = número de fagócitos fagocitando /100 fagócitos e IF = número total de leveduras fagocitadas / número de fagócitos fagocitando.

2.3. Microbiologia

Foram realizadas coletas a cada 21 dias, com cinco indivíduos por tratamento, eutanasiados para coleta do trato intestinal com a finalidade de realizar o cultivo bacteriano. Foi feita assepsia do local do corte com álcool 70% G.L. e dos instrumentos cirúrgicos e o intestino foi separado em placa de Petri esterilizada. O intestino foi fragmentado, acondicionado em tubos de ensaio e pesados com auxílio de balança analítica. Após a pesagem, os fragmentos dos intestinos foram macerados em tubos de ensaio previamente esterilizados,

diluídos em séries de 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, homogeneizados por vórtex (Ishikawa, 1998) e semeados em duplicata em placas de Petri estéreis contendo meio de cultura TSA (Agar Tripticaseína de Soja) (Irianto e Austin, 2002). As placas foram incubadas em estufa a 30 ^{0}C, por 72 h, para posterior contagem das colônias (Tachibana et al., 2010). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

2.4. Análises estatísticas

Para averiguar os resultados dos parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos dos diferentes tratamentos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bartlett's para verificar a homogeneidade dos dados e o teste de Tukey quando houve diferenças entre os tratamentos. Os resultados foram considerados significativos quando $P<0.05$ (Zar, 2009).

3. Resultados e Discussão

Parâmetros hematológicos são considerados importantes indicadores da saúde dos animais em geral, incluindo-se os peixes (Chen et al., 2004; Martins et al., 2004; Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Na tabela 4 constam os valores médios dos parâmetros hematológicos da série vermelha do sangue das tilápias utilizadas neste estudo.

Durante os 21 dias correspondentes à 1ª biometria, os valores médios de Hb, Ht, VCM e HCM não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Estudos mostram que a redução no percentual de hematócrito e número de eritrócitos no sangue podem ser sinais de infecção bacteriana (McNulty et al., 2003; Benli e Yildiz, 2004; Shoemaker et al., 2006). Os jovens de tilápia do Nilo não apresentaram diferenças significativas no 21º dias, porém os valores RBC foram menores nos peixes do T1 e T4. No entanto, estes valores são semelhantes aos descritos por Martins et al., (2004), mesmo os animais estando em condições diferentes do presente trabalho.

As variações de Ht nos animais do tratamento T3 foram superiores aos demais tratamentos, sugerindo que o probiótico adicionado após o

processamento parece atuar sobre este parâmetro quando incorporado na ração peletizada. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tratamentos ($P<0.05$). No T1 (controle) este mesmo parâmetro mostrou diferenças significativas entre os peixes alimentados sem probiótico quando comparados aos dos tratamentos T3 e T5 alimentados com probiótico. Nas condições experimentais as dosagens de probiótico testadas propiciaram alteração nos valores dos índices hematimétricos concordando com os de Flores et al., (2002) que testaram probiótico comercial contendo uma mescla de bactérias de *Streptococcus faeciumn e Lactobacillus acidophilus* para tilápias do Nilo. Aos 42º e 63º dias, os valores de Ht não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados foram semelhantes aos de Ueda et al., (1997), Tavares-Dias et al., (2000; 2002), Hisano et al., (2003) e Tavares-Dias (2003). Esse parâmetro pode revelar, em parte, o nível de estresse aos quais os indivíduos estavam expostos (Martins et al., 2004).

Os valores de Hb não foram significativos durante o experimento, entretanto, sua variação foi similar aos reportados, para a mesma espécie, por Alkahem (1994); Ueda et al., (1997); Tavares-Dias e Faustino (1998) e Tavares-Dias et al., (2000).

No 42º dias apenas os valores de RBC foram estatisticamente superiores nos tratamentos T1, T2, T4 e T5 quando comparados aos do T3 (tabela 4) corroborando comparativamente aos encontrados por Tavares-Dias e Faustino (1998); Adeparusi e Atayi (2000); Rodrigues et al., (2002) e Hisano et al., (2003).

Aos 42º e 63º dias os valores médios de VCM, HCM e CHCM não diferiram estatisticamente ($P<0.05$) (tabela 4). A literatura descreve resultados semelhantes aos de Ueda et al., (1997); Tavares-Dias e Faustino (1998); Adeparusi e Ajayi (2000); Tavares-Dias et al., (2000); Rodrigues et al., (2002) e Tavares-Dias et al., (2002).

Neste presente estudo os maiores valores de RBC coincidiram com a elevação dos índices de Ht e RBC, entretanto houve diminuição do CHCM, parâmetros os quais são inversamente proporcionais indicando que as concentrações de hemoglobina no sangue dos jovens sofreram queda.

O tamanho reduzido dos eritrócitos mostra um caminho mais curto para difusão de oxigênio, além de uma maior concentração de Hb. Estas alterações

possibilitaram o consumo de oxigênio nas brânquias e a liberação de oxigênio em diferentes tecidos, segundo Moyle e Cech Jr, (1982).

O estresse de manejo no início do experimento ocasionou aumento significativo até o 21º dias como, o Ht coincidindo com a elevação de Hb, RBC e VCM, porém, com diminuição do CHCM nos tratamentos T3 e T5. Isto significa que os peixes produziram células maiores (imaturas provavelmente) e com menor concentração de Hb no interior das células como resultado da adição do probiótico na ração. Ao final de 63 dias esses valores se estabilizaram.

Neste estudo os parâmetros hematológicos da série vermelha dizem respeito ao estado geral da saúde dos peixes por não apresentarem alterações significativas, indicando que os mesmos encontram-se saudáveis e corroborando com estudos de Ishikawa et al., (2007); Barros et al., (2009) e Harikrishnan et al., (2010).

Os valores do número de trombócitos encontram-se na Tabela 5, foram contados pelo método indireto, através de extensões sanguíneas, não apresentando diferenças entre os tratamentos, porém, os resultados foram inferiores aos verificados por Ueda et al., (1997) e Tavares-Dias (2003) com variação do número de trombócitos entre 38,540.00-100,800.00 μL^{-1}. Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), além da variação interespecífica, as diferenças nas metodologias empregadas na contagem de trombócitos são responsáveis pela amplitude das variações do número de trombócitos. De acordo com Ueda et al., (2001) os eritrócitos são as células que se apresentam em maior número no sangue periférico de peixes, logo em seguida, os trombócitos.

Embora trombócitos e leucócitos sejam células de linhagens diferentes, sob o ponto de vista da Patologia, são agrupados nas contagens relativas e denominados células sanguíneas de defesa orgânica (Tavares-Dias et al., 2000).

Autores atribuíram as funções destas células nos peixes, entre elas, a importância no processo de coagulação (Casillas e Smith, 1977) e fagocitose (Hill e Rowley, 1996).

Os valores absolutos e percentuais encontrados para os diferentes leucócitos encontram-se na Tabela 6. Em relação aos leucócitos foram observados linfócitos, neutrófilos, monócitos e basófilos, corroborando as análises realizadas por Ueda et al., (1997; 2001), Ranzani-Paiva et al., (2005) e

Barros et al., (2009), para tilápias. Essas células apresentaram padrão compatível com os descritos na literatura (Tavares-Dias, 2003; Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Diferenças significativas não foram ocorreram entre os tratamentos para o número absoluto de leucócitos. Esses valores encontrados estão dentro da amplitude de variação de 7300,00 a 66947,50 μL^{-1} de leucócitos para a mesma espécie concordando com Ueda et al., (1997); Tavares Dias (2003) e Delbon (2006).

A variação do número de linfócitos no presente trabalho não foi significativa entre tratamentos e tempos. Em trabalhos com tilápia do Nilo realizados por Ueda et al., (1997); Tavares-Dias e Faustino (1998) e Tavares-Dias e Moraes (2003) os autores encontraram valores superiores aos nossos.

Em relação à função destas células nos peixes, Ellis (1977), atribuiu a essas células a característica de imunocompetentes.

Os neutrófilos mobilizam-se rapidamente para o local da injúria minimizando a expansão das doenças e iniciando a resposta imune. Doggett e Harris (1989) consideram os neutrófilos como as maiores células fagocíticas, visto que ingerem tanto partículas de carbono com bactérias.

No presente experimento, o número de monócitos superou o de neutrófilos contrariando outros estudos com a mesma espécie (Hrubec et al., 2000; Tavares-Dias e Moraes, 2003; Ghiraldelli et al., 2006).

Em relação à função dos monócitos, Imagawa et al., (1989) observaram a capacidade destas células de ingerir partículas.

Foi constatada a presença discreta de basófilos na contagem diferencial no sangue dos peixes deste experimento. A baixa freqüência também foi relatada em diferentes espécies de peixes por Ranzani Paiva e Godinho, (1983) e Veiga et al., (2000). Basófilos e eosinófilos são geralmente escassos no sangue de peixes, mas estudos de Pitombeira e Martins (1970) e Ezzat et al., (1974), indicam que há diferenciação de células entre as espécies de peixes.

A função dos basófilos dos peixes ainda não está bem definida e parece estar associada aos processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (Roberts, 1981).

Bittencourt et al., (2003), não encontraram basófilos ou eosinófilos, nem seus precursores, no sangue periférico de *O. niloticus*, criados em sistema

semi-intensivo, e Tavares-Dias (2003) também não registrou eosinófilos assim como em nosso estudo.

Com esses valores observados no experimento pode se indicar que os peixes estavam em boas condições.

Tabela 4

Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos e hematimétricos realizadas durante o experimento.

Aos 21 dias						
Tratamentos	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM
T1	19.64 ± 1.21 [a]	6.57 ± 0.43 [a]	151.00 ± 9.17 [a]	132.65 ± 13.00 [a]	44.65 ± 5.06 [a]	33.48 ± 1.08 [a]
T2	25.30 ± 1.74 [ab]	6.46 ± 0.83 [a]	183.20 ± 6.86 [a]	137.50 ± 4.77 [a]	34.77 ± 3.30 [a]	25.09 ± 1.61 [b]
T3	30.70 ± 1.41 [b]	8.47 ± 0.10 [a]	186.20 ± 20.08 [a]	172.32 ± 17.51 [a]	48.48 ± 7.06 [a]	27.80 ± 1.24 [b]
T4	26.13 ± 3.34 [ab]	6.72 ± 0.88 [a]	169.13 ± 27.16 [a]	157.25 ± 9.89 [a]	40.37 ± 2.25 [a]	25.71 ± 0.32 [b]
T5	28.60 ± 2.58 [b]	7.22 ± 0.60 [a]	182.90 ± 15.04 [a]	156.03 ± 4.66 [a]	39.49 ± 1.38 [a]	25.32 ± 0.65 [b]
Aos 42 dias						
T1	31.30 ± 2.18 [a]	8.19 ± 0.29 [a]	244.60 ± 13.66 [a]	129.06 ± 9.29 [a]	33.83 ± 1.90 [a]	26.40 ± 0.92 [a]
T2	27.30 ± 3.36 [a]	8.24 ± 0.46 [a]	203.60 ± 9.28 [ab]	135.67 ± 19.07 [a]	40.78 ± 2.99 [a]	31.44 ± 2.97 [a]
T3	26.70 ± 1.20 [a]	7.40 ± 0.67 [a]	179.60 ± 10.13 [b]	150.49 ± 10.92 [a]	41.18 ± 3.07 [a]	27.64 ± 2.06 [a]
T4	30.80 ± 2.92 [a]	8.40 ± 0.55 [a]	243.90 ± 20.77 [a]	127.20 ± 10.40 [a]	34.74 ± 1.20 [a]	27.80 ± 1.72 [a]
T5	25.70 ± 2.35 [a]	7.67 ± 1.15 [a]	217.40 ± 15.83 [ab]	121.64 ± 16.94 [a]	35.66 ± 5.76 [a]	29.35 ± 3.33 [a]
Aos 63 dias						
T1	28.60 ± 2.75 [a]	7.62 ± 0.64 [a]	157.00 ± 18.63 [a]	187.63 ± 16.24 [a]	50.22 ± 4.54 [a]	26.85 ± 0.96 [a]
T2	29.20 ± 0.90 [a]	7.74 ± 0.24 [a]	193.40 ± 17.86 [a]	155.42 ± 13.38 [a]	41.29 ± 3.72 [a]	26.54 ± 0.67 [a]
T3	31.00 ± 2.45 [a]	7.32 ± 0.38 [a]	195.90 ± 20.97 [a]	167.00 ± 24.92 [a]	39.19 ± 4.96 [a]	23.86 ± 1.06 [a]
T4	26.20 ± 1.36 [a]	7.58 ± 0.61 [a]	155.70 ± 14.47 [a]	172.02 ± 11.75 [a]	49.01 ± 1.72 [a]	28.77 ± 1.13 [a]
T5	33.70 ± 2.54 [a]	7.93 ± 0.75 [a]	215.80 ± 19.60 [a]	168.93 ± 14.30 [a]	37.65 ± 3.97 [a]	22.82 ± 2.81 [a]

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g 100 mL^{-1}); Er = número de eritrócitos (10^4 mm^{-3}); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = Hemoglobina Corpuscular Média (%) CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%);
Letras iguais na coluna diferem significativamente segundo teste de Tukey ($P< 0.05$).

Tabela 5

Médias e erro padrão da contagem de trombócitos realizadas durante o experimento.

Tratamentos	Tb
	Aos 21 dias
T1	18005.50 ± 3010.71
T2	19529.50 ± 2831.57
T3	20566.50 ± 1526.26
T4	19654.38 ± 3316.14
T5	20690.00 ± 2626.85
	Aos 42 dias
T1	21028.00 ± 3406.38
T2	19775.00 ± 1767.28
T3	18722.50 ± 1850.89
T4	20670.00 ± 3375.97
T5	19803.00 ± 1997.00
	Aos 63 dias
T1	17497.50 ± 3546.89
T2	19308.50 ± 1920.40
T3	16064.50 ± 1853.72
T4	17963.00 ± 2213.76
T5	16692.00 ± 1350.71

Não foram observadas diferenças significativas quando $P<0.05$
Tb = trombócitos (μL^{-1})

Tabela 6

Médias e erro padrão da contagem total e diferencial dos leucócitos realizadas durante o experimento.

Tratamentos	Lc	Lf	Mn	Nt	Bs
			Aos 21 dias		
T1	21715.50 ± 2012.25	16513.19 ± 1566.46	2483.26 ± 174.00	2719.05 ± 544.32	0.00 ± 0.00
T2	23303.50 ± 1939.87	17085.42 ± 1455.29	3574.22 ± 771.82	2582.62 ± 242.53	61.25 ± 23.34
T3	23685.50 ± 2094.47	18356.13 ± 1471.83	2949.64 ± 522.17	2333.42 ± 336.44	46.31 ± 28.50
T4	21765.63 ± 1959.05	16948.06 ± 1959.76	2362.67 ± 174.89	2454.90 ± 427.81	0.00 ± 0.00
T5	24205.50 ± 2354.03	18416.88 ± 1647.56	3367.07 ± 437.48	2338.61 ± 358.34	82.95 ± 54.89
			Aos 42 dias		
T1	21414.00 ± 3276.78	15851.31 ± 2520.73	2424.41 ± 457.44	3113.50 ± 416.70	24.77 ± 24.77
T2	22245.50 ± 4110.22	16379.26 ± 2770.30	3159.86 ± 355.23	2646.48 ± 529.82	59.90 ± 35.94
T3	23610.00 ± 2666.75	18031.07 ± 1811.91	2973.28 ± 552.21	2576.51 ± 365.43	29.15 ± 29.15
T4	19992.50 ± 1562.39	14507.79 ± 1198.20	2497.50 ± 243.59	2987.21 ± 459.70	0.00 ± 0.00
T5	22239.00 ± 1572.65	16954.65 ± 1047.55	2431.02 ± 385.31	2813.11 ± 562.47	40.22 ± 36.72
			Aos 63 dias		
T1	19613.00 ± 2604.49	15463.79 ± 1961.61	2026.46 ± 382.44	2103.28 ± 240.97	19.47 ± 19.47
T2	22157.50 ± 2876.39	17716.55 ± 2214.43	2345.28 ± 455.71	2039.41 ± 154.89	56.27 ± 51.36
T3	21135.00 ± 3169.31	17084.54 ± 2555.14	2328.09 ± 469.45	1691.48 ± 125.78	30.90 ± 18.94
T4	19356.00 ± 2233.46	15187.43 ± 1397.60	2168.72 ± 603.33	1999.85 ± 232.53	0.00 ± 0.00
T5	22072.00 ± 4438.08	17347.42 ± 3325.90	2433.89 ± 456.84	2234.81 ± 604.32	55.89 ± 51.02

Não foram observadas diferenças significativas quando $P<0.05$

Lc = leucócitos totais (μL^{-1}); Lf = linfócitos (μL^{-1}); Mn = monócitos (μL^{-1}); Nt = neutrófilos (μL^{-1}); Bs = basófilos (μL^{-1}); Es = eosinófilos (μL^{-1}).

A figura 1 mostra a capacidade e o índice fagocítico entre os tratamentos durante o experimento.

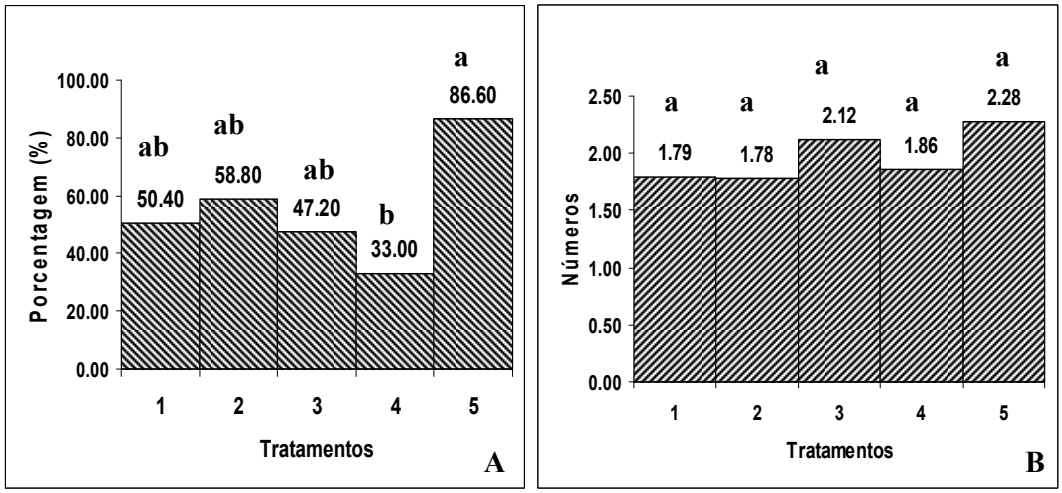


Figura 1 – Capacidade Fagocítica (A) e Índice Fagocítico (B) de macrófagos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas sem e com probiótico, ao final de 63 dias (1= controle peletizada, 2 = peletizada antes, 3 = peletizada depois, 4 = controle extrusada e 5 = extrusada depois).

Os valores médios da CF apresentaram diferenças significativas entre os peixes alimentados com as dietas extrusadas nos tratamentos T4 e T5 indicando que o probiótico apresentou um efeito imunocompetente. Entretanto, os alimentados com as dietas peletizadas, nos tratamentos T1, T2 e T3 não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

O IF fornece informações à respeito da quantidade de microrganismos estranhos ao organismo que cada macrófago ativo foi capaz de fagocitar através da contagem do número de leveduras dentro de uma dada célula, porém, no presente estudo não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, o mesmo foi observado por Dias (2010) em estudo com matrinxãs, *Brycon amazonicus*.

Nayak et al., (2007) estudando tilápias, *O. niloticus* alimentadas durante duas semanas com *L. rhamnosus* observaram a estimulação na atividade fagocitária.

Células fagocíticas ativas no lavado abdominal (com leveduras em seu interior) e o número de leveduras no interior de cada célula estão representados na Figura 2.

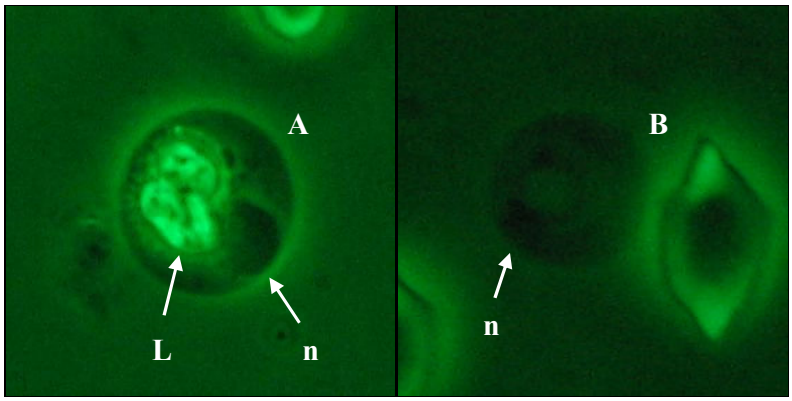


Figura 2. Fotomicrografia de células fagocíticas presentes em tilápias do Nilo. (A – células fagocitando leveduras e B – célula fagocítica inativa) n = núcleo e L= leveduras (400 X).

A tabela 7 mostra a contagem de colônias de bactérias na ração e as recuperadas do trato intestinal de jovens de tilápias do Nilo. As bactérias probióticas só apresentaram efeitos biológicos no ambiente intestinal quando atingiram um número mínimo de Unidades Formadoras de Colônias - UFC de acordo com Oksanen et al., (1990).

Tabela 7

Contagem de UFC g^{-1} realizada na ração antes do início do experimento e a recuperação de bactérias probióticas do trato intestinal de jovens de tilápias do Nilo no 63º dias de experimento.

Tratamentos	Dieta experimental	Trato intestinal
Peletizada	$1.0x10^{1}$	$1.4x10^{2}$
Peletizada antes	$3.8x10^{7}$	$4.9x10^{5}$
Peletizada depois	$2.1x10^{7}$	$1.3x10^{5}$
Extrusada	$1.0x10^{1}$	$1.5x10^{2}$
Extrusada depois	$3.8x10^{6}$	$9.3x10^{4}$

UFC = Unidade formadora de colônias

A microbiota bacteriana intestinal de organismos aquáticos, ao contrário dos organismos terrestres, é constituída predominantemente por bactérias Gram negativas, podendo variar de acordo com o ambiente, escassez de nutrientes ou pelo uso de bactérias probióticas (Gatesoupe, 2008).

Este experimento foi realizado com bactérias Gram positivas comprovando que as bactérias adicionadas à ração colonizaram o trato intestinal dos peixes. Dados semelhantes aos nossos são mostrados em pós-larvas de tilápias por Tachibana et al., (2010) em experimento com *Bacillus subtilis*, conseguindo a quantidade de $1.15x10^4$ e $4.74x10^5$ UFC, em tratamentos com ração contendo 5 e 10g de probiótico kg^{-1}, respectivamente. Já Meurer et al., (2006; 2007 e 2008) observaram a colonização da levedura, *S. cerevisae* quando alimentou pós-larvas e alevinos de tilápia do Nilo.

Jatobá et al., (2008), utilizando bactérias ácido láticas em tilápias notaram alterações na microbiota bacteriana melhorando a resposta inespecífica das tilápias contra a infecção experimental com *Enterococcus durans*. Assim, a presença das bactérias ácido-lácticas no trato intestinal das tilápias alimentadas com probiótico indica que os peixes possivelmente apresentam-se imunocompetentes para combater as enfermidades.

A recuperação das bactérias probióticas é importante para certificar que estas foram consumidas e continuam viáveis no intestino dos peixes para agirem como probiótico (Tachibana et al., 2010). Entretanto, a adesão e a colonização do trato gastro-intestinal não pode ser confirmada com esta análise, somente com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Ringo et al., 2003).

4. Conclusões

A utilização do probiótico foi eficaz para promover o aumento da imunidade em jovens de tilápia do Nilo alimentadas na dieta extrusada. Foi possível recuperar as bactérias probióticas do intestino. Pode-se afirmar que esses exemplares mantiveram-se sadios, embora os parâmetros hematológicos não sofreram alterações durante o período experimental.

5. Agradecimentos

O primeiro autor é grato à *FAPESP* (processo nº 2009/01530-8). Os autores agradecem à *Empresa IMEVE Biotecnologia – Indústria de Medicamentos Veterinários Ltda;* à *Empresa Fri-ribe S/A*; à *Universidade Federal de São Carlos –*

UFSCar e ao *Centro de Aquicultura da UNESP* – CAUNESP. Ao Dr *Carlos Massatoshi Ishikawa* pela colaboração nas análises microbiológicas.

6. Referências bibliográficas

Adeparusi, E. O., Atayi, A. D. 2000. Hematological characteristics of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed differently processed Lima beam (*Phaseolus lunatus* L.) diets. In: Proceeding from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture, 131-137.

Alkahem, H. F. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on hematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. Journal University Kwait Science, 21: 243-252.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC .1990. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington: AOAC, p.1298.

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.

Barros, M. M., Ranzani Paiva, M. J. T., Pezzato, L. E., Falcon, D. R., Guimarães, I. G. 2009. Hematological response and growth performance of Nile Tilapia fed diets containing folic acid. Aquaculture Research, 40: 895-903,

Benli, A. C. K., Yildiz, H. Y. 2004. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. Aquaculture Research, 35: 1388-1390.

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.

Burr, G., Gatlin, D., Ricke, S. 2005. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finfish Aquaculture. Journal of World Aquaculture Society, 36: 425-436.

Casillas, 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.

Chen, C. Y., Wooster, G. A., Bowser, P. R. 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or

Streptococcus iniae or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulphate. Aquaculture, 239: 421-443.

Cross, M. L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunology and Medical Microbiology,34: 245-253.

Delbon, M. C. 2006. Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal. disponível em http://www.caunesp.unesp.br/Publicacoes/ Dissertacoes_Teses/Dissertacoes/Dissertacao%20Marina%20Carvalho%20Delbon.pdf, acesso em 25/05/2010

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., Probióticos no desempenho produtivo, hematologia e migração de macrófagos do matrinxã, *Bricon amazonicus*. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

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

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

Ezzat, A. A. Shabana, M. B., Farghaly, A. M. 1974. Studies on the blood characteristics of *Tilapia zillii* (Gervais). I. Blood cells. Journal of Fish Biology, 6: 1-12.

FAO/WHO, 2001. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 1-4 October 2001, Cordoba, Argentina. Available at: ftp://ftp.fao.org/ es/esn/food/probio_report_en.pdf (Accessed 23 August 2009).

Flores, M. L., Briones, L. E., Novoa, M. A. O. 2002. Avances en utilizacion de probiótico como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) In: Cruz-Suárez, L.E., et al.. (EDS.). Avances en nutricion acuícola. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuícola.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals: A review. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, 66: 365-378.

Gatesoupe, F. J. 2008. Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments. Journal Molecular Microbiology Biotechnology, 14: 107-114.

Ghiraldelli, L., Martins, M. L., Yamashita, M. M., Jerônimo, G. T. 2006. Ectoparasites influence on the haematological parameters of Nile tilapia and carp cultured in the State of Santa Catarina, South Brazil. Journal of Fish and Aquatic Science, 1: 270-276.

Gill, H. S., Rutherfurd, K. J., Prasad, J., Gopal, P. K., 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). British Journal of Nutrition, 83: 167-176

Gullian, M., Thompson F. and Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunoestimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 233: 1-14.

Harikrishnan. R., Balasundaram, C., Heo, M. S. 2010. Supplementation Diet Containing Probiotics, Herbal and Azadirachtin on Hematological and Biochemical Changes In *Cirrhina mrigala* Against *Aphanomyces invadans*. Fisheries and Aquaculture Journal, Volume 2010: FAJ-4

Hill, D. J.; Rowley, A. F. 1996. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. Britany Journal of Haematology, 92: 200-211.

Hisano, H., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Kleemann, G. K., Freire, E. S., Gonçalves, G. S., Zuanon, J. A. S., Sá, M. V. C. Yeast and zinc on hematological parameters of nile tilapia fingerlings. 2003. *Oreochromis niloticus*. In: World Aquaculture, Salvador, BA, Anais..., p.575.

Hrube, T. C..; Smith, S. A. 1998. Hematology of fish. In: Schalm's Veterinary Hematology, 1998. 5ª ed., 1120-1125.

Hrubec, T. C., Cardinale, J. L., Smith, S. A. 2000. Hematology and chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* hybrid). Veterinary Clinical Pathology, 29: 7-12.

Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., Kudo, N., Sugimura, M. 1989. Morphology of blood cells in carp *(Cyprinus carpio L.)*. Japan Journal of Veterinary Scienc, 51: 1163-1172.

Irianto, A., Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 25: 333–342.

Ishikawa, C. M. 1998. Quantificação bacteriana e avaliação das lesões em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) inoculadas experimentalmente com *Mycobacterium marinum* ATCC 927. (Dissertação de mestrado). USP. São Paulo, SP

Ishikawa, N. M., Ranzani-Paiva, M. J. T., Lombardi, J. V., Ferreira, C. M., 2007. Hematological Parameters in Nile Tilápia, *Oreochromis niloticus,* exposed to sub-letal concentrations of mercury. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50: 619-626

Jatobá, A., Vieira, F. N., Buglione, C., Silva, B. C., Mouriño, J. L. P., Jerônimo, G.T., Dotta, G., Martins, M. L. 2008. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43: 1201-1207.

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: 1-14.

Kubitza, F. 1999. Nutrição e alimentação dos peixes cultivados. 3ªed. Jundiaí: Kubitza, F. pp.123.

Martins, M. L., Pilarsky, F., Onaka, E. M., Nomura, D. T., Fenerick, J., Ribeiro, K., Miyazaki, D. M. Y., Castro, M. P., Malheiros, E. B. 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. Boletim do Instituto de Pesca, 30: 71-80.

Matushima, E. R., Mariano, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swinbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*,* São Paulo, 33 (1): 5-10.

McNulty, S. T., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., Evans, J. J. 2003. Hematological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. Journal of World Aquaculture Society, 34: 418-422.

Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M. M., Mauerwerk, V. L., Freccia, A. 2006. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. Revista Brasileira de Zootecnia, 35: 1881-1886.

Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M. M., Mauerwerk, V. L., Freccia, A. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-nilo submetidos a desafio sanitário. Revista Brasileira de Zootecnia, 36: 1219-1224.

Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M. M., Mauerwerk, V. L., Mascioli, A. S., Colpini, L. M. S., Freccia, A. 2008. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 9: 804-812.

Moyle, P. B., Cech Jr, J. J. 1982. Fishes: An Introduction to Ichthyology. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Nageswara, P. V., Babu D. E. 2006. Probiotics as an alternative therapy to minimize or avoid antibiotics use in aquaculture. Fishing Chimes, 26 (1): 112-114.

National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Warm water, Fishes and Shellfishes: Nutrient Requirements of Domestic Animals. Washington. pp.125.

Nayak, S. K., Swain, P., Mukherjee, S.C. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham). Fish and Shellfish Immunology, 23: 892-896.

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

Oksanen, P., Salminen, S., Saxelin, M., Hamalainen, P., Ihantola-Vormisto, A., Muurasniemi-Isoviita, L., Nikkara, S., Oksanen, T., Porsti, T., Salminen, E., Siitonen, S., Stuckey, H., Toppila, A., Vapaatalo, H. 1990. Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG. Annals of Medicine, 22: 53-56.

Pitombeira, M. S., Martins, J. M. 1970. Haematology of the Spanish mackerel, *Scomberomorus maculatus.* Copeia*,* 1: 182-186.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Godinho, H. M. 1983. Sobre células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Revista Brasileira de Biologia, 43: 331-338.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Silva-Souza, A. 2004. Hematologia de peixes Brasileiros In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M. A. P. Sanidade de Organismos Aquáticos, Varela, São Paulo, 89-120.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Felizardo, N. N., Luque, J. L. 2005. Parasitological and hematological analysis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. Acta Scientiarum, 27: 231-237.

Rengpipat, S.; Rukpratanpon, S.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasaveta, P. 2000. Inmunity enhancement in black tiger shirimp (*Penaeus monodon)* by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271-288.

Ringo, E., Gatesoupe, F., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160: 177–203.

Ringo, E., Olsen, R. E., Mayhewc, T. M., Myklebustd, R. 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. Aquaculture, 227:1-4.

Roberts, R. J. 1981.Patologia de los peces. Madrid: Mundi –Prensa, 366 p.

Rodrigues, E. L., Missima, F., Azevedo, T. D. 2002. Análises hematológicas do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), mantidas em pesque-pague ao longo das estações do ano. In: VII Encontro Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos, Foz de Iguaçu, PR, Anais..., 41.

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 do Instituto Butantã, 20: 329-334.

Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. Indian Journal of Microbiology, 48: 299-308.

Selvin, J.; Huxley, A. J.,Lipton, P. 2004. Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. Aquaculture, 230: 242-248.

Shoemaker, C. A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Welker, T. L., Klesius, P. 2006. Growth response and acquired resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) that survived *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture Research, 37: 1238-1245.

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 0ºC by macrophage of *Notothenia coriiceps*. Journal Fish Biology, 60: 466-478.

Silva, J. R. M. C., Porto-Neto, L. R., Borges J. C. S., Jensch-Junior B. E. 2005. Germicide capacity of macrophages in the Antartic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0ºC. Polar Biology, 28 (4): 326-328.

Tachibana, L., Dias, D. C., Ishikawa, C. M., Correa, C. F., Leonardo, A. F. G., Ranzani-Paiva, M. J. T. 2010. Probiótico na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758): desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. Bioikos (prelo).

Tavares-Dias, M., Faustino, C. D. 1998. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extrensivo. Ars Veterinária, 14: 254-263.

Tavares-Dias, M., Frascá-Scorvo, C. M. D., Novato, P. F. C., Moraes, F. R. 2000. Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolopis hornorum* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: Proceeding of the 5th International Symposium on Tilapia Aquaculture, Anais…, 533-541.

Tavares-Dias, M., Moraes, F. R., Martins, M. L., Santana, A. E. 2002. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. Boletim do Instituto de Pesca, 28: 1-9.

Tavares-Dias, M. 2003. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. 248 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturadas em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. Bioscience Journal, 19: 107-114.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R. 2004. Hematologia de Peixes Teleósteos. Ed. Eletrônica e Arte Final. Riberão Preto. SP. 144p.

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.

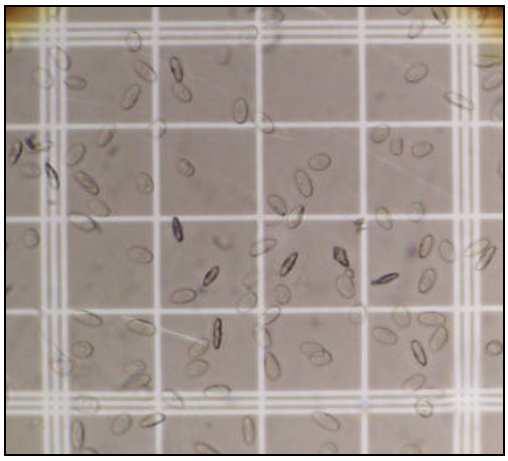
Ueda, I. K., Egami, M. I., Sasso, W. S., Matushima, E. R. 2001. Citochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromes* (*Tilapia*) *niloticus* (Linnaeus,1758) (Cichlidae, Teleóste) – Part II. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 38: 273-277

Veiga, M. L., Egami, M. I., Ranzani-Paiva, M. J. T., Rodrigues, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). Revista Chilena de Anatomia, 18: 245-250.

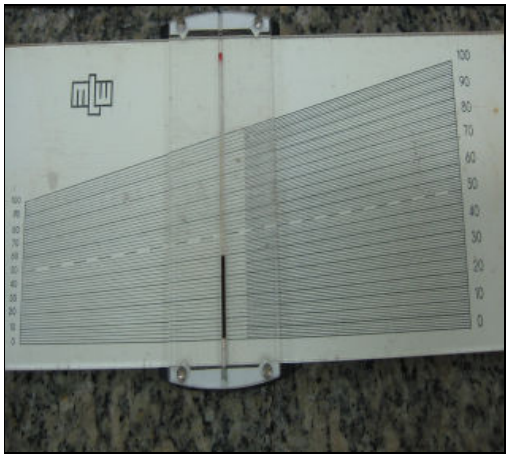
Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 655-671.

Zar, J. H. 2009. Biostatistical Analysis. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 576 p.

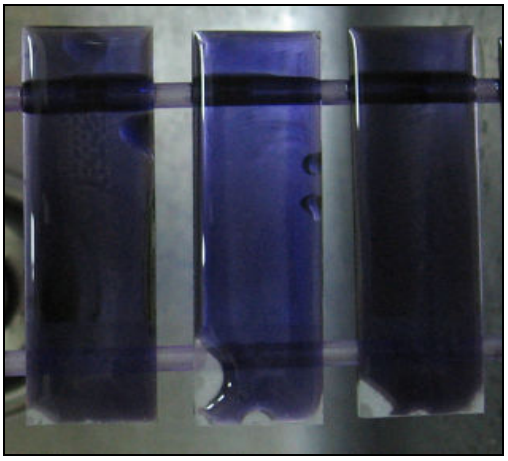
7. Apêndices



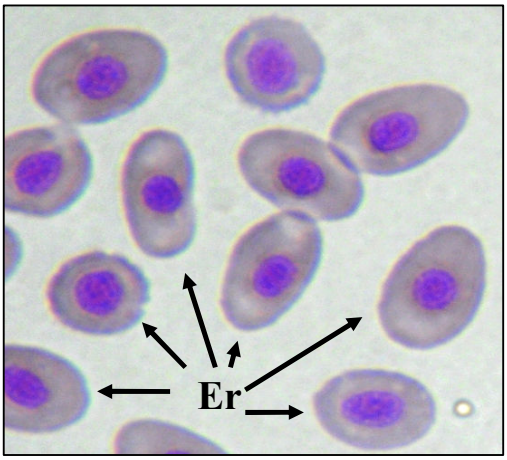
Coleta de sangue e contagem de eritrócitos

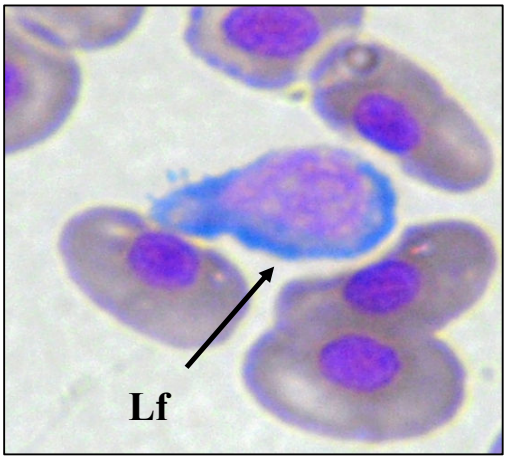


Espectrofotômetro - Hemoglobina e Tabela de hematócrito

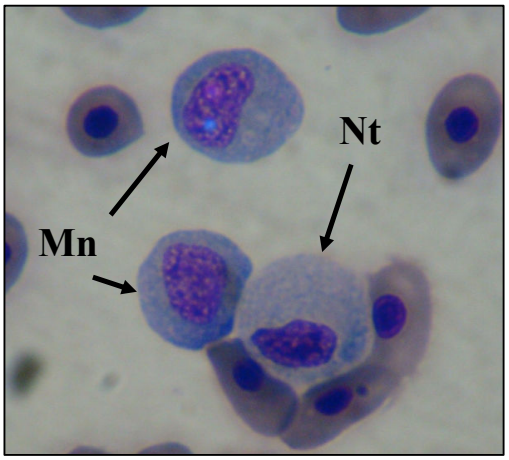


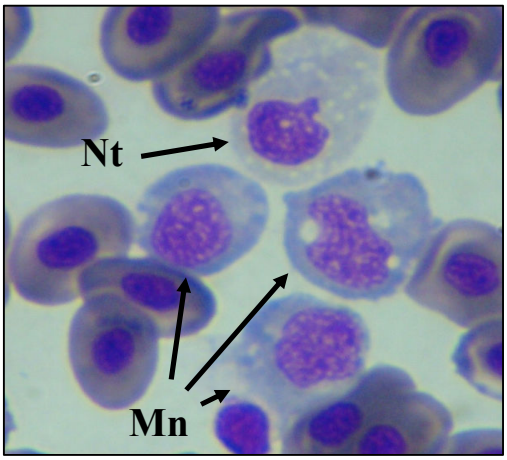
Lâminas de extensão sanguinea



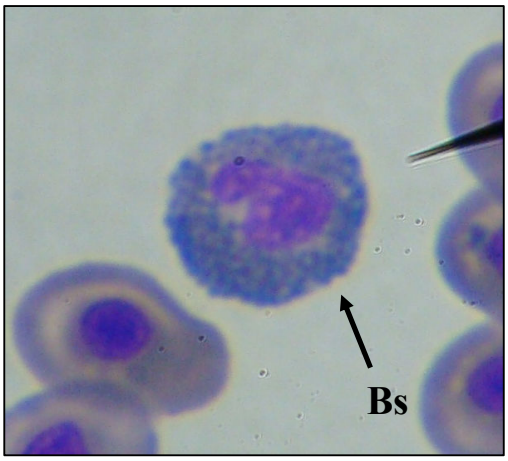


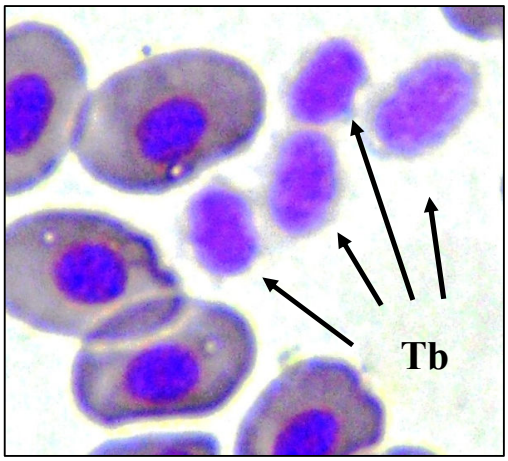
Eritrócitos e Linfócito



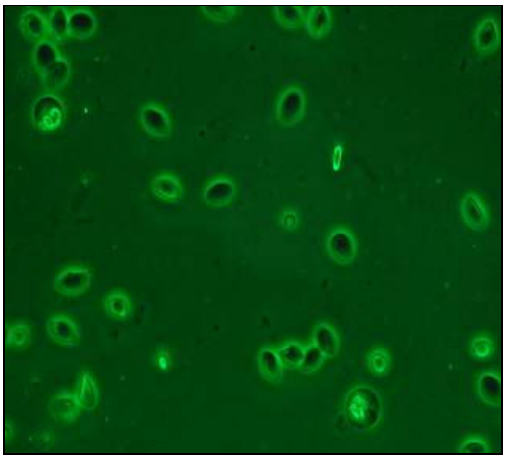


Neutrófilos e Monócitos

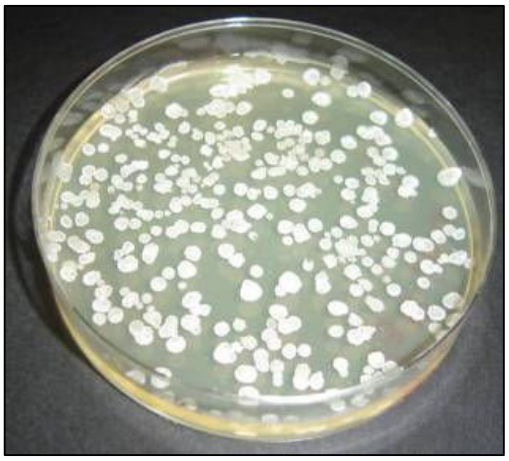




Basófilo e Trombócitos



Análise Imunológica



Análise Microbiológica

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Partindo do conhecimento prévio sobre os efeitos do probiótico sugere-se que outros experimentos sejam realizados, dentre eles, o efeito do probiótico a campo (produção de pescado), a utilização de diferentes concentrações do produto, avaliação frente a desafio sanitário, estresse e manejo, a viabilidade, o custo e beneficio na agregação à ração, verificar nas diferentes fases de desenvolvimento do animal (larvas, pós-larvas, jovens, adultos), para que se tenha uma base sólida de informações sobre o produto.