

**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 AQUICULTURA E PESCA**

**PROBIÓTICO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO
CRIADA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM**

Guilherme Silveira Telli

**Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva
Co-orientador: Leonardo Tachibana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA – SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo
Outubro – 2012**

**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 AQUICULTURA E PESCA**

**PROBIÓTICO NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO
CRIADAS EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM**

Guilherme Silveira Telli

**Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva
Co-orientador: Leonardo Tachibana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA – SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo
Outubro – 2012**

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

T294p Telli, Guilherme Silveira

..... Probiótico na alimentação de Tilápia-do-nylo criada em diferentes densidades
de estocagem / Guilherme Silveira Telli -- São Paulo, 2012.

ix, 51f. ; il. ; graf. ; tab.

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

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva.

1. Desempenho zootécnico. 2. Hematologia. 3. Atividade fagocítica. 4. Lisozima.
5. Densidade de estocagem. I. Ranzani-Paiva, Maria José Tavares. II. Título.

CDD 639.3

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 TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“Probiótico na alimentação de tilápia-do-nilo criada em diferentes densidades de estocagem”

AUTOR: Guilherme Silveira Telli

ORIENTADOR: Profª. Drª. Maria José Tavares Ranzani Paiva

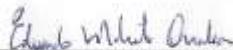
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Profª. Drª. Maria José Tavares Ranzani Paiva



Prof. Dr. Fabiana Garcia Scaloppi



Prof. Dr. Eduardo Makoto Onaka

Data da realização: 25 de outubro de 2012



Presidente da Comissão Examinadora
Profª. Drª. Maria José Tavares Ranzani Paiva

AGRADECIMENTOS

A meus pais, **Renato** e **Marcia**, por nunca terem poupado esforços para conceder a melhor educação possível a seus filhos.

A meu irmão, **Daniel** pela grande amizade e companheirismo.

A minha namorada, **Andressa Somensi** pelo modelo de dedicação, amor, companheirismo e pela infinita paciência por me aguentar por todos esses anos juntos.

À minha orientadora, **Dr^a. Maria José Tavares Ranzani Paiva**, pelos conselhos, apoio, amizade, pela confiança em mim depositada e pelas valiosas aulas sobre a língua portuguesa que recebi durante o período de realização desta dissertação.

Ao **Instituto de Pesca - APTA/SAA-SP** e ao **Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca** pela oportunidade da realização da pós-graduação, bem como, a todos os pesquisadores do Instituto de Pesca.

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

Aos funcionários da APTA - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, **Jair Donizetti Mazzafero**, **Claudio Cirineu Ciola**, **Helio Sanches Mariscal**, **Tereza Jacintho de Souza** e **Aparecida Conceição Mariscal** pela ajuda, companheirismo e ensinamentos durante a realização dos experimentos.

Aos amigos **Leonardo Tachibana**, **Danielle de Carla Dias**, **Carlos Massatoshi Ishikawa**, **Fabio Rosa Sussel** e **Edson Ferreira Machado** pela amizade, conselhos e apoio durante todo esse período.

Aos colegas e amigos do Instituto de Pesca pelas alegrias e conhecimentos compartilhados.

À banca examinadora, **Dr. Antenor Santos Aguiar** e ao **Dr. Giovanni Gonçalves Sampaio**, pelas contribuições e sugestões no exame de qualificação.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio financeiro (2011/09174-6) e bolsa de treinamento técnico (2011/20669-7).

A **Capex** (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
4. APRESENTAÇÃO DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO.....	17
Capítulo 1: PROBIÓTICO NA RAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO CRIADA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM.....	17
RESUMO.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPITULO 2: HEMATOLOGIA E RESPOSTA IMUNE INATA DE TILÁPIA-DO- NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO COM PROBIÓTICO E CRIADA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM.....	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51

RESUMO

Objetivou-se avaliar o desempenho zootécnico, composição corporal, recuperação da bactéria probiótica no intestino, hematologia e o sistema imune inato de tilápia-do-nylo, (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com ração contendo o probiótico, *Bacillus subtilis*, e criada em duas densidades de estocagem. Foram utilizadas 520 tilápias revertidas com peso médio de $32,63 \pm 1,25$ g, distribuídos em 16 tanques de 800L. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial 2x2, com duas densidades de estocagem, (18,75 peixes m⁻³ e 62,50 peixes m⁻³) e duas rações (controle e probiótico) durante 84 dias. A ração com probiótico foi suplementada com 5×10^9 UFC de *B. subtilis* por quilo de ração. Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no desempenho zootécnico, composição corporal e nos níveis de cortisol e glicose entre os peixes que receberam a ração com ou sem probiótico. Foram observados menores ganho em peso, consumo de ração e taxa de crescimento específico nos peixes criados na maior densidade de estocagem tanto dos peixes controle quanto dos peixes que receberam o probiótico. O *B. subtilis* manteve-se viável após passagem pelo estômago, possibilitando a utilização como probiótico. Maiores valores de lisozima plasmática e do índice fagocítico foram observados nos peixes que receberam o probiótico, quando criados na maior densidade de estocagem. Os peixes que receberam o probiótico, quando criados na maior densidade de estocagem apresentaram menores valores no número de eritrócitos e hematócrito, contudo os eritrócitos apresentaram maiores valores de hemoglobina corpuscular média. A densidade de estocagem mostrou-se um agente estressor ocasionando um menor crescimento dos peixes com o aumento da densidade de estocagem. A inclusão da bactéria probiótica *B. subtilis* na concentração de 5×10^9 UFC/kg⁻¹ de ração beneficiou o sistema imune inato de tilápia-do-nylo ao estresse relacionado a maior densidade de estocagem, aumentando os níveis de lisozima plasmática e o índice fagocítico.

Palavras-chave: desempenho zootécnico, hematologia, atividade fagocítica, lisozima, densidade de estocagem

ABSTRACT

The aim was to evaluate the growth performance, body composition, recovery of probiotic bacteria in the gut, hematology and innate immune system of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diet containing the probiotic, *Bacillus subtilis*, and raised in two densities stocking. Have been used five hundred and twenty male tilapia (32.63 ± 1.25 g), distributed in 16 aquariums 800L each, The experimental design was completely randomized with four replications in a factorial scheme 2x2, with two stocking density, (18, 75 fish m⁻³) and (62.50 fish m⁻³) and two diets (control and probiotic). A diet with probiotic was supplemented with 5×10^9 CFU kg⁻¹ feed. There were no statistical differences ($p < 0.05$) on the growth performance, body composition and levels of cortisol and glucose of the animals fed with or without probiotic. Differences were found in growth performance between fish reared at two stocking density, with reduced weight gain, feed intake and specific growth rate on high stocking density. The *B. subtilis* remained viable after passage through the stomach, allowing the use as probiotic. Higher values ($p < 0.05$) were found in the levels of lysozyme and phagocytic activity of macrophages in fish fed with *B. subtilis* when reared at high stocking density. The probiotic caused a decrease in the number of erythrocytes and hematocrit levels in fish reared in high stocking density, but these erythrocytes showed higher values of mean corpuscular hemoglobin. The stocking density proved to be a stressor causing a reduction in growth at high density. The inclusion of probiotic bacteria *B. subtilis* at a concentration of 5×10^9 CFU kg feed⁻¹ benefited the innate immune system of Nile tilapia to stress related to high densities, increasing plasma levels of lysozyme and phagocytic activity of macrophages.

Key words: *Bacillus subtilis*, growth performance, *Oreochromis niloticus*, hematology, innate immune system, stocking density

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com a atual demanda mundial por alimentos faz-se necessário a busca de soluções para a obtenção de fontes seguras de proteínas de origem animal para o consumo humano. A atividade pesqueira encontra-se estagnada, devidos aos grandes esforços de pesca aplicados. Com isso a aquicultura tende a ser a grande responsável para suprir a demanda mundial para esse tipo de produto. O pescado é uma das mais ricas fontes de proteína animal sendo um dos setores de produção que mais crescem no mundo. Em 2007, a população mundial obteve 16,6% de suas necessidades em proteína animal por meio da ingestão de peixes, e a demanda por parte do consumidor continua a aumentar (FAO, 2011).

A produção mundial de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, chegou a 2,5 milhões de toneladas em 2009, sendo a quinta espécie mais produzida na aquicultura neste ano (FAO, 2011). No mesmo ano no Brasil, a criação de tilápias representou 39% (132.957,8 t) da produção de pescado proveniente da aquicultura continental, com aumento de 20% somente entre os anos de 2008 e 2009 (MPA, 2012). Essa produção é concentrada principalmente nas regiões do nordeste e sudeste do Brasil, sendo o tanque-rede o sistema de criação predominante.

No entanto, a criação dessa espécie, assim como de qualquer outra, está sujeita a várias fontes de estresse, das quais as mais comuns são, manipulação dos animais, altas densidades de estocagens, alimentação inadequada, baixa qualidade da água e transporte. Em um sistema intensivo de produção, os fatores estressantes ocasionados pelo próprio cultivo se somam aos causados pelos fatores ambientais, tornando este um estresse crônico. Este estado acarreta em desequilíbrio da homeostase fisiológica, redução do crescimento e capacidade reprodutiva e da supressão do sistema imune, tornando o peixe susceptível a doenças (Wendelaar-Bonga, 1997; Van Weerd e Komen, 1998). Assim com a intensificação da criação de peixes, diferentes fatores estressores se apresentam; dessa maneira, é essencial que o sistema imune funcione adequadamente para garantir a saúde e as condições fisiológicas dos peixes cultivados (Urbinati e Carneiro, 2004).

Os antibióticos têm sido empregados em larviculturas comerciais e em fazendas de cultivo, a fim de controlar a proliferação de patógenos (Gatesoupe, 1989). A

utilização de antibióticos no tratamento de doenças bacterianas e como promotor de crescimento na criação de peixes, pode contaminar corpos d'água, pode gerar resistência das bactérias às drogas e deixar resíduos nos peixes cultivados, assim como em populações selvagens localizadas nos entornos das pisciculturas (Cabello, 2006). No Brasil, além dos problemas citados acima, ocorridos nas fazendas de cultivo, barreiras econômicas também dificultaram o escoamento da produção para mercados internacionais (Maia e Nunes, 2003).

A fim de reduzir os prejuízos ocasionados pela utilização de antibióticos e pelas mortalidades causadas por patógenos, surgem algumas alternativas mais eficazes e seguras na prevenção de doenças. Neste sentido, nos últimos anos vêm-se intensificando as pesquisas com o uso de alimentos funcionais como, por exemplo, os probióticos.

Os probióticos foram originalmente descritos como organismos ou substâncias com a capacidade de equilibrar a microbiota intestinal (Parker, 1974). Posteriormente o termo probiótico foi descrito como microrganismos quando administrados em adequadas quantidades conferem benefícios na saúde do hospedeiro (FAO, 2001).

Os probióticos podem estimular o crescimento, inibir o desenvolvimento de patógenos, melhorar o funcionamento do sistema imunológico e aumentar a tolerância ao estresse (Gatesoupe, 1999; Verschuere et al., 2000; Balcázar et al., 2006; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Wang et al., 2008).

O sistema imune dos peixes apresenta dois tipos de respostas, a resposta imune inata, que funcionam como uma primeira barreira contra microrganismos, e resposta imune específica, responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e produção de anticorpos específicos (Bernstein et al., 1998). O sistema imunológico dos peixes difere de outros vertebrados pelo fato da resposta inata ser mais expressiva do que a resposta adquirida (Sauraby e Sahoo, 2008).

A imunidade inata é composta por vários componentes que incluem células, proteínas, glicoproteínas e peptídeos, presentes em tecidos e fluidos corporais e que possuem ação antimicrobiana. As células fagocíticas desempenham um importante papel na regulação do sistema imune inato, os macrófagos são capazes de reconhecer patógenos e materiais estranhos e degradá-los pelo processo de fagocitose (Secombes, 1990; Steinhagen e Jendrysek, 1994). O muco, soro e ovos de peixes contém grande variedade de substâncias que inibem o crescimento de microrganismos infecciosos. Estas substâncias são predominantemente proteínas e glicoproteínas, compreendendo a

lisozima, complemento, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina (Shoemaker et al., 2001).

A administração de probióticos como forma de modular o sistema imunológico tem sido estudada em varias espécies de peixes. Incrementos na atividade fagocítica dos macrófagos e produção de lisozimas, pela administração de probióticos em peixes foram descritos por vários autores (Kim e Austin, 2006, Newaj-Fyzul et al., 2007, Harikrishnan et al., 2010, Geng et al., 2011). Newaj-Fyzul et al., (2007) demonstrou que truta arco-íris (30g) recebendo 1×10^7 UFC de *B. subtilis* AB1 por grama de ração por um período de 14 dias apresentaram maiores valores de lisozima no soro e intestino e incremento na atividade fagocítica e burst respiratório. Aly et al. (2008) observaram aumentos da lisozima e da atividade respiratória dos leucócitos em tilápia-do-nilo ($5 \pm 1.3g$) recebendo ração suplementada com (1×10^7 UFC.g⁻¹) *B. subtilis* e (1×10^7 UFC.g⁻¹) *Lactobacillus acidophilus* fornecidas separadamente e em conjunto.

Populações de microrganismos probióticos associados ao muco do intestino podem promover competição, produção de bacteriocinas e liberação de outros compostos antimicrobianos no muco que melhoram a função protetora da camada mucosa contra agentes patogênicos e exerce um papel imunoestimulador ao hospedeiro (Kim & Austin, 2006; Newaj-Fyzul et al., 2007). Alterações na morfologia intestinal foram relatadas em tilápia quando alimentada com probióticos, leveduras e aminoácidos (De Rodriganez et al., 2009; Merrifield et al., 2010; Carvalho et al., 2011; Silva et al., 2010; Medri et al., 1999). Estas alterações apresentam caráter benéfico, promovendo maior área de absorção da mucosa intestinal de tilápia-do-nilo, que pode implicar em maior eficiência na utilização dos nutrientes (Hisano et al., 2006; Fabregat, 2006).

Os gêneros dos probióticos mais utilizados com sucesso na piscicultura em água doce são as bactérias *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e as leveduras *Saccharomyces* (Verschuere et al., 2000; Wang et al., 2008; Aly et al., 2008; Lara-Flores et al., 2003; Meurer et al., 2006 e 2008). *O B. subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e demonstrou capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *Aeromonas hydrophila* e na alimentação da tilápia-do-nilo foi eficaz como promotor de crescimento (Aly et al., 2008). A administração de *B. subtilis* na água de criação da tilápia-do-nilo apresentou efeitos positivos no crescimento e nos parâmetros imunológicos (Zhou et al., 2009).

Uma maior tolerância ao estresse foi demonstrada em peixes e camarões alimentados com probióticos (Taoka et al. 2009; Liu et al., 2010; Rollo et al., 2006). Em

trabalho realizado por Varela et al. (2010) com *Sparus aurata*, observou-se que a alta densidade de estocagem (30 kg m^{-3}) nos peixes alimentados com o probiótico Pdp 11 (Família Alteromonadaceae – *Shewanella putrefaciens*) aumentou a tolerância ao estresse e o crescimento quando comparados ao controle sem probiótico. Ainda os mesmos autores citam que os níveis de cortisol medido no sangue dos peixes em baixa densidade ($5,6 \text{ kg m}^{-3}$) não foram modificados pela alimentação com o probiótico, sendo necessário algum tipo de estresse como a alta densidade de estocagem para que a alimentação com o probiótico apresentasse efeito.

Lara-Flores et al. (2003) avaliaram o efeito da inclusão da mistura de *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* e, outra dieta contendo *Saccharomyces cerevisiae* e observaram que os peixes que receberam a mistura de bactérias obtiveram uma taxa de crescimento específico maior em relação ao grupo controle. O grupo que recebeu a levedura teve crescimento e sobrevivência superior ao grupo controle, demonstrando que estes probióticos podem ser utilizados como promotores de crescimento na criação de tilápia. No entanto, este autor cita a importância de haver algum desafio ou condição estressante para o probiótico conseguir demonstrar efeitos benéficos no hospedeiro. Neste experimento a alta densidade de estocagem permitiu a demonstração destes efeitos.

Dessa forma, o presente estudo apresenta os efeitos da inclusão da bactéria probiótica *Bacillus subtilis* na ração da tilápia-do-nilo criada em diferentes densidades de estocagem.

2. OBJETIVOS

Avaliar o desempenho zootécnico, composição corporal, confirmar a presença do probiótico no intestino, avaliar os parâmetros hematológicos e a resposta imune inata de tilápia-do-nilo alimentada com ração suplementada com o probiótico, *Bacillus subtilis*, sob duas densidades de estocagem.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALY, S.M.; AHMED Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A. & MOHAMED, M.M. 2008 Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish immunology*, 25:128-136.
- BALCÁZAR, J.L., DE BLAS, I., RUÍZ-ZARZUELA, I., CUNNINGHAM, D., VENDRELL, D., MÚZQUIZ, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173–186.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. 1998 In: Evans, D.H. *The physiology of fishes*. 2ed. Boca Raton: CRC Press, p.215-242.
- CABELLO, F.C. 2006 Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7):1137-1144.
- CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; COSTA, D.S.P.; MOREIRA, E.L.T.; PINTO, L.F.B.; ABREU, R.D.; ALBINATI, R.C.B. 2011 Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, Salvador, v.12, n.1, p.176-187.
- DE RODRIGANEZ, M.S., DIAZ-ROSALES, P., CHABRILLON, et al. 2009 Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition* 15: 177–185.
- DIAS, D. C.; LEONARDO, A. F. G. ; TACHIBANA, L. et al. (2012) Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 40-45.
- FABREGAT, T.E.H.P. 2006 *Utilização do prebiótico flavofeed® como suplemento; dietário para juvenis de tilápia do nilo Oreochromis niloticus*. 42f. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2001 *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. In the Joint FAO/WHO Expert Consultation report on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 1-4.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2011 Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department. FAO yearbook. *Fishery and Aquaculture Statistics 2009*. Rome, p.28.
- GATESOUBE, F.J. 1989 The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v. 83, p. 39–44.
- GATESOUBE, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p.147-165.
- GENG X, DONG XH, TAN BP, YANG QH, CHI SY, LIU HY, LIU XQ.2011 Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol*. Sep;31(3):400-6.
- HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., HEO, M. 2010 Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 29, pp. 868–874.

- HISANO, H., SILVA, M. D. P., BARROS, M. M., et al. 2006 Levedura integra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Scientiarum*, 28: 311-318.
- 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.
- KIM D.-H. & AUSTIN B. 2006 Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunology*, 21, 513–524.
- LARA-FLORES, M.; OLEVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B.E. & LÓPEZ-MADRID, W. 2003 Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216.:193-201.
- LIU, K.F., CHIU, C.H., SHIU, Y.L., CHENG, W., LIU, C.H. 2010 Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 837-844.
- MAIA, E.P.; NUNES, A.J.P. 2003 Cultivo de *Farfantepenaeus subtilis*, resultados das performances de engorda intensiva. *Panorama da Aqüicultura*, v. 13(79), p. 36-41.
- MEDRI, V., PEREIRA, G. V., LEONHARDT, J. H., et al. 1999 Avaliação sensorial de files de tilápias alimentadas com diferentes níveis de levedura alcooleira. *Acta Scientiarum*, 21: 303-308.
- MERRIFIELD, D.L., DIMITROGLOU, A., FOEY, A., et al. 2010 The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1–18.
- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M.M., et al. 2008 Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9 : 804-812.
- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M.M., et al. 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.
- MPA. 2012 *Boletim Estatístico da pesca e aqüicultura*. Brasil 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.
- NEWAJ-FYZUL A., ADESIYUNZ A.A., MUTANI A., et al. 2007 *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 103, 1699–1706.
- PARKER R.B. 1974 Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, 29:4-8.
- ROLLO A, SULPIZIO R, NARDI M, SILVI S, ORPIANESI C, CAGGIANO M, et al. 2006 Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiol Biochem*, 32:167-177..
- SAURABH, S.; SAHOO, P.K. 2008 Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39: 223-239.
- SECOMBES, C.J. 1990 Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven: SOS Publications, p.137-154.
- SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; PLUMB, J.A. 1997 Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet. Immunol. Immunopatho*, v.58, p.181-190.

- SILVA, L. C. R., FURUYA, W.M., NATALI, M. R. M., et al. 2010 Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.6, p.1175-1179.
- STEINHAGEN D, AND JENDRYSEK, S. 1994 Phagocytosis by carp granulocytes; in vivo and in vitro observations. *Fish Shellfish Immunol* 4:521-524.
- TAOKA, Y., MAEDA, H., JO, J.Y., et al. 2006 Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72, 310–321.
- URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. 2004 *Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva*. In Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Castagnolli, N. (Eds.). *Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical*. Editora TecArt. p. 171-193.
- VAN-WEERD, J.H.; KOMEN, J. 1998 The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.120, p.107-112.
- VARELA J.L., RUÍZ-JARABO I, VARGAS-CHACOFF L, ARIJO S, LEÓN RUBIO JM, GARCÍA MILLÁN I, MARTÍN DEL RÍO MP, MORIÑIGO MA, MANCERA JM. 2010 Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*. 265 - 271.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P., et al. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, p.655-671.
- WANG, Y.-B., LI, J.-R., LIN, J. 2008 Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281, 1–4.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v.77, p.591-625.
- 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.

4. APRESENTAÇÃO DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO

Para facilitar a publicação dos resultados, após a incorporação das sugestões feitas pela banca examinadora, a dissertação será apresentada em dois capítulos (Artigos científicos) seguindo as normas das revistas a que serão submetidos. No primeiro capítulo constam as normas da revista “Boletim do Instituto de Pesca” e no segundo, as normas da “Aquaculture Research”.

Capítulo 1: PROBIÓTICO NA RAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO CRIADA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

Capítulo 2: HEMATOLOGIA E RESPOSTA IMUNE INATA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO COM PROBIÓTICO E CRIADA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

CAPITULO 1:
PROBIÓTICO NA RAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO CRIADA EM
DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

Probiótico na ração de tilápia-do-nilo criada em diferentes densidades de estocagem

RESUMO

Objetivou-se avaliar o desempenho zootécnico, composição corporal e a recuperação da bactéria probiótica no intestino de tilápia-do-nilo, (*Oreochromis niloticus*), alimentada com ração contendo o probiótico *Bacillus subtilis* e criada em duas densidades de estocagem. Foram utilizados 520 juvenis de tilápia revertidos ($32,63 \pm 1,25$ g), distribuídos em 16 tanques de 800L. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial 2x2, com duas densidades de estocagem ($18,75$ peixes m^{-3} e $62,50$ peixes m^{-3}) e duas rações (controle e probiótico) A ração com probiótico foi suplementada com $5 \cdot 10^9$ UFC kg^{-1} de ração. Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no desempenho zootécnico, composição corporal entre os peixes que receberam a ração com ou sem probiótico. Foram observados menores valores no ganho em peso, consumo de ração e taxa de crescimento específico nos peixes criados na maior densidade de estocagem tanto dos peixes controle quanto dos peixes que receberam a ração com probiótico. O *B. subtilis* manteve-se viável após passagem pelo estômago, possibilitando sua utilização como probiótico. Assim a inclusão do probiótico com ração na dosagem de $5 \cdot 10^9$ UFC por quilo de ração não influenciou o desempenho zootécnico e a composição corporal dos peixes. A elevada densidade de estocagem mostrou-se um agente estressor ocasionando um menor consumo de ração, com conseqüente menor crescimento.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, desempenho zootécnico, *Oreochromis niloticus*, composição corporal, densidade de estocagem, recuperação do probiótico

INTRODUÇÃO

O peixe é uma das mais ricas fontes de proteína animal, sendo a piscicultura um dos setores de produção que mais crescem no mundo. Em 2007, a população mundial obteve 16,6% de suas necessidades em proteína animal por meio da ingestão de peixes, e a demanda por parte do consumidor continua a aumentar (FAO, 2011).

A produção mundial de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em 2009, chegou a 2,5 milhões de toneladas, sendo a quinta espécie mais produzida na aquicultura neste ano (FAO, 2011). No Brasil, a criação de tilápias representou 39% (132.957,8 t) da produção de pescado proveniente da aquicultura continental em 2009, com aumento de 20% somente entre os anos de 2008 e 2009 (MPA, 2012). Essa produção é concentrada principalmente nas regiões do nordeste e sudeste do Brasil, sendo o tanque-rede o sistema de criação predominante.

A fim de reduzir os prejuízos com mortalidades causadas por patógenos e gastos com antibióticos, surgem algumas alternativas eficazes e seguras na prevenção de doenças. Neste sentido, nos últimos anos vêm-se intensificando as pesquisas com o uso de alimentos funcionais como, por exemplo, os probióticos. A capacidade dos probióticos de incrementar o crescimento em peixes teleósteos foi demonstrada em espécies como *Oreochromis niloticus* (El-Haroum et al., 2006), *Dicentrarchus labrax* (Carnevali et al., 2006) e *Paralichthys olivaceus* (Taoka et al., 2006).

Os probióticos foram originalmente descritos como “organismos ou substâncias com a capacidade de equilibrar a microbiota intestinal” (Parker, 1974). Posteriormente o termo probiótico foi complementado como “microrganismos quando administrados em adequadas quantidades conferem benefícios na saúde do hospedeiro” (FAO, 2001). Estes microrganismos apresentam efeitos em diferentes níveis: inibição do crescimento de patógenos, incremento imunológico, estimulação no crescimento e aumento da

tolerância ao estresse (Gatesoupe, 1999, Verschuere et al., 2000, Balcázar et al., 2006, Kesarcodi-Watson et al., 2008, Wang et al., 2008).

A digestão dos alimentos pode ser afetada devido ao funcionamento ideal das células das vilosidades intestinais, que absorvem os nutrientes com maior eficiência quando bactérias benéficas estão presentes (Hisano et al., 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico, composição corporal e recuperação da bactéria probiótica no intestino de tilápia do Nilo, alimentadas com ração contendo probiótico *Bacillus subtilis* e criadas em diferentes densidades de estocagem.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA)/Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP, durante 84 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial 2x2, com duas densidades de estocagem (baixa e alta) e duas dietas (controle e probiótico).

Foram utilizadas 520 tilápias ($32,63 \pm 1,25\text{g}$) linhagem GIFT revertidas para macho e distribuídas em 16 tanques com volume útil de 800L. Cada tanque apresentava fluxo de água ($2,5 \text{ L min}^{-1}$) e aeração contínua e individual para evitar a contaminação cruzada com as bactérias probióticas. Termostatos foram instalados em todos os tanques.

Os peixes foram estocados em duas densidades de estocagem, sendo denominadas baixa densidade ($18,75 \text{ peixes m}^{-3}$) e alta densidade ($62,50 \text{ peixes m}^{-3}$). Diariamente foram avaliados os parâmetros da água, como oxigênio dissolvido, pH e temperatura, e

semanalmente verificado amônia total (Kit Labcon™). Os parâmetros físicos e químicos da água estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Valores médios e desvios padrões dos parâmetros da qualidade da água registrados durante o período experimental.

Densidade	Controle		Probiótico	
	BD	AD	BD	AD
Temperatura (°C)	25,2±0,5	25,1±0,5	25,0±0,4	25,0±1,0
pH	6,9±0,0	6,6±0,0	6,9±0,0	6,7±0,1
Oxigênio dissolvido (mg l ⁻¹)	6,2±0,9	5,2±1,1	6,0±0,9	5,3±1,2
Amônia (mg l ⁻¹)	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25

BD= baixa densidade 18,75 peixes m⁻³, AD=alta densidade 62,5 peixes m⁻³.

Os parâmetros de desempenho foram avaliados por meio de biometrias a cada 21 dias, anotando-se individualmente o comprimento total e peso dos peixes. Os parâmetros avaliados foram: ganho em peso, sobrevivência, consumo de ração, conversão alimentar aparente, fator de condição, taxa de eficiência proteica e taxa de crescimento específico.

Foram preparadas duas rações experimentais extrusadas, isoprotéicas e isocalóricas com diâmetro médio de 2mm, sendo a dieta controle (Tabela 2) e a dieta com inclusão da bactéria *Bacillus subtilis* na concentração de 5x10⁹ UFC kg⁻¹ de ração. O probiótico utilizado foi o CALSPORIN® que contem 10¹⁰ UFC da bactéria *Bacillus subtilis* – liofilizada por grama do produto. O probiótico foi pesado em balança analítica, homogeneizado em óleo de soja (20mL kg⁻¹ de ração) e aspergido sobre a ração. A mesma quantidade de óleo foi adicionada à dieta controle. As dietas foram mantidas sob temperatura de 4°C e fornecida três vezes ao dia até a saciedade.

Tabela 2. Composição da dieta experimental (base na matéria natural)

Rações	Controle	Probiótico
Ingrediente	%	%
Farelo de soja	40,5	40,5
Glúten de milho	5,86	5,86
Farinha de peixe	10	10
Milho	36,45	36,40
L-lisina	0,49	0,49
DL-metionina	0,4	0,4
Treonina	0,15	0,15
Fosfato bicálcico	3,8	3,8
Vitamina C	0,08	0,08
Suplemento vit./mineral ¹	0,25	0,25
BHT ²	0,02	0,02
Óleo de soja	2,0	2,0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0,05
Composição químico-bromatológica da ração³		
Proteína bruta (%)	34,17	34,17
Proteína digestível (%)	27,00	27,00
Energia bruta (kcal/kg)	3.916	3.916
Energia digestível (kcal/kg)	3.042	3.042
Extrato etéreo (%)	2,47	2,47
Fibra bruta (%)	5,86	5,86
Lisina	2,25	2,25
Metionina	0,80	0,80
Treonina	1,17	1,17
Cálcio total (%)	1,50	1,50
Fósforo disponível (%)	0,70	0,70
Cinza (%)	8,85	8,85

¹ Suplemento vitamínico e mineral/kg de suplemento (Supre Mais): vitA 1200000 UI; vitD₃ 200000 UI; vitE 12000 mg; vitK₃ 2400 mg; vitB₁ 4800 mg; vitB₂ 4800 mg; vitB₆ 48000 mg; B₁₂ 4800 mg; ác. fólico 1200 mg; ác. Pantotênico 12000 mg; vitC 48 mg; biotina 48 mg; colina 65 mg; niacina 24000 mg; Fe 10000 mg; Cu 600 mg; Mn 4000 mg; Zn 6000 mg; I 20 mg; Co 2 mg e Se 20 mg.

² Butil Hidroxi Tolueno

³ Calculado segundo Pezzato et al. (2002)

Ao final do experimento dois peixes de cada repetição foram sedados com benzocaína, mortos, congelados inteiros e enviados ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) para realização das análises da composição centesimal corporal. As amostras coletadas foram congeladas, moídas e homogeneizadas para determinação de umidade,

extrato etéreo, proteína bruta e cinzas de acordo com os métodos propostos pela AOAC (1984)

Ao final do experimento, dois peixes de cada repetição foram sedados, mortos e realizados a coleta da porção anterior do intestino para avaliar a presença do probiótico *B. subtilis*. Uma porção de 3 a 4 g da porção do intestino anterior foi separada, fragmentada e acondicionada em tubos de ensaio estéreis e pesadas em balança analítica. Após maceração foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} em solução fisiológica 0,7%, seguidas de homogeneização em vortex (Ishikawa, 1998). Cem microlitros de cada solução foi semeada (duplicata) em placas de Petri com meio TSA (Agar Tripticaseína de Soja) (Irianto & Austin, 2002) e incubadas em estufa a 30°C por 48h, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

Os resultados foram analisados por análise de variância ANOVA e comparados por teste de Duncan, sendo que as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Foi utilizado o software SAS (Statistical Analysis System) versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram encontradas diferenças significativas no desempenho zootécnico entre os tratamentos que receberam ou não, o probiótico. Os valores de desempenho estão representados na Tabela 3.

A inclusão do probiótico na ração não causou efeitos no ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência das tilápias quando criadas em baixa e alta densidade de estocagem. Os peixes criados em alta densidade de estocagem apresentaram menor ($p < 0,05$) consumo de ração, ganho em peso, comprimento final, peso final e na taxa de crescimento específico do que os criados em baixa densidade de estocagem.

Tabela 3: Valores médios e desvios padrões individuais dos parâmetros de desempenho zootécnico de tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, alimentada com *B. subtilis* e criada em diferentes densidades de estocagem durante 84 dias.

Densidade	Controle		Probiótico	
	BD	AD	BD	AD
Peso final (g)	184,27±3,36 ^a	167,84±1,18 ^b	185,67±4,57 ^a	167,24±2,66 ^b
Comprimento final (cm)	20,66±0,20 ^a	19,77±0,40 ^b	20,76±0,23 ^a	20,10±0,32 ^{ab}
Ganho em peso (g)	151,01±4,32 ^a	135,52±1,22 ^b	153,13±3,76 ^a	134,86±2,44 ^b
Taxa de crescimento específico (% dia ⁻¹)	2,03±0,06 ^{ab}	1,96±0,01 ^{bc}	2,07±0,07 ^a	1,95±0,01 ^c
Conversão alimentar	1,12±0,06	1,06±0,00	1,10±0,04	1,07±0,02
Consumo ração (g)	168,90±5,70 ^a	144,78±1,60 ^b	168,36±4,77 ^a	145,42±3,14 ^b
Taxa eficiência protéica	2,48±0,15	2,60±0,01	2,52±0,10	2,57±0,06
Fator de condição	2,08±0,04	2,17±0,11	2,07±0,03	2,06±0,10
Sobrevivência (%)	98,30±3,30	99,50±1,00	98,30±3,30	99,50±1,00

BD= baixa densidade 18,75 peixes m⁻³, AD=alta densidade 62,5 peixes m⁻³. Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Os resultados estão de acordo com os encontrados por Meurer et al., (2008), que não observaram diferenças no desempenho zootécnico de tilápia-do-nilo, alimentadas com ração contendo *Sacharomyces cerevisiae* durante a fase de reversão sexual. Makridis et al., (2000) não obtiveram diferenças no desempenho e sobrevivência de turbot (*Scophthalmus maximus*) recebendo duas cepas de bactérias isoladas do próprio peixe quando adicionadas na água de cultivo ou fornecidas bioencapsuladas em rotíferos. Suzer et al., (2008) trabalhando com probiótico comercial composto de *Lactobacillus* spp. Na dieta não encontrou diferenças na taxa de crescimento em *Spaurus aurata*.

Resultados contrários ao encontrado neste estudo foram observados por Aly et al. (2008), que mostraram que a adição de 1x10⁷ UFC de *B. subtilis* g⁻¹ de ração para alevinos de tilápia-do-nilo (5,2±0,9g) resultou em melhores ganhos de peso quando comparados ao tratamento controle. El- Haroum et al., (2008) observaram melhores valores para ganho de peso e conversão alimentar, em tilápias alimentadas com uma mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, alicina e enzimas hidrolíticas. As diferenças

entre os resultados se devem às diferenças entre os delineamentos experimentais, formas de cultivo (monosexo ou não), linhagem do peixe, peso inicial, dosagens utilizadas e diferenças entre as cepas dos probióticos utilizadas.

O *B. subtilis*, é classificado como transitório no trato gastrintestinal, pois não possui a capacidade de se fixar ao epitélio intestinal, mas a de auxiliar na multiplicação e colonização dos produtores de ácido láctico (Maruta, 2001). Por ser uma bactéria transitória no trato intestinal, esta pode não ter produzido ou produzido quantidades insuficientes de enzimas digestivas a fim de aumentar a digestibilidade dos nutrientes do alimento. Podendo esta bactéria estar influenciando o sistema imunológico através da competição, produção de compostos inibidores do crescimento de patógenos e criando melhores condições para a colonização de bactérias ácido lácticas.

O consumo de ração, ganho de peso, peso final e taxa de crescimento específico apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre as duas densidades de estocagem tanto para os peixes controle quanto para os que receberam a ração com probiótico, sendo observada menores valores destes parâmetros nos peixes criados na alta densidade de estocagem.

Os peixes alimentados com a ração controle apresentaram diferenças no comprimento final, apresentando diferentes valores de comprimento final quando comparadas as duas densidade de estocagem. Tal diferença não ocorreu nos peixes alimentados com probiótico, que apresentaram os mesmos valores de comprimento final entre as duas densidades de estocagem.

A alta densidade de estocagem pode ser considerada um agente estressor em peixes, causando alterações fisiológicas, como a supressão do sistema imunológico, perda do equilíbrio osmótico e diminuição da alimentação, com conseqüente redução do crescimento (Gomes et al., 2000). Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam que o manejo relacionado à maior densidade restringiu o apetite dos peixes

e, conseqüentemente o crescimento. Assim como os resultados encontrados neste trabalho, Ridha (2006), Gall & Bakar (1999) e Silva et al. (2002), trabalhando com tilápia, observaram tendência de redução no peso médio com o aumento da densidade de estocagem.

A composição corporal dos peixes pode ser manipulada pela quantidade e qualidade dos nutrientes da dieta, pelo nível de arraçoamento, regime de alimentação, dentre outros fatores (Shearer, 1994; Jobling, 2001).

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas para o teor de umidade na composição corporal dos peixes alimentados com a ração controle, não sendo observadas diferenças para os demais parâmetros (Tabela 4). Em relação ao tratamento controle, os peixes mantidos em alta densidade apresentaram maiores teores de umidade (71,22%) do que os mantidos em baixa densidade (69,48%).

Martins et al., (2009) observaram alterações na composição corporal, principalmente de umidade e teores de lipídeos e a dinâmica de deposição destes elementos em diferentes estágios de desenvolvimento de tilápias. O percentual de lipídeos nos peixes tende a substituir a umidade com o crescimento, alcançando seu valor máximo no verão e declinando no inverno e em períodos de migração e desova.

Não foram encontradas diferenças na composição corporal dos peixes alimentados ou não com probiótico quando criados nas diferentes densidades de estocagem. Dias et al. (2012), não encontraram diferenças significativas nos valores de extrato etéreo do músculo e fígado de *Brycon amazonicus* quando alimentadas com dietas contendo *B. subtilis*, porém, estes autores observaram tendência de redução deste parâmetro com a inclusão do probiótico.

Tabela 4: Composição do corpo inteiro de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, alimentada com *B. subtilis* adicionado a ração e criadas em diferentes densidades de estocagem durante 84 dias. Valores expressos na matéria natural.

Densidade	Controle		Probiótico	
	BD	AD	BD	AD
Cinzas	4,14±0,22	3,84±0,45	3,49±0,64	4,15±0,75
Umidade	69,48±0,76 ^b	71,22±0,47 ^a	70,28±1,06 ^b	70,30±0,93 ^b
Proteína	16,49±0,79	15,55±0,85	15,98±0,93	15,82±0,89
Extrato etéreo	9,57±0,70	8,51±0,62	9,62±1,17	9,50±0,64

BD= baixa densidade 18,75 peixes m⁻³, AD=alta densidade 62,5 peixes m⁻³. ^{ab}Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Valores da composição corporal semelhantes ao observados no estudo, foram obtidos por Martins et al. (2009) analisando a composição corporal de diferentes linhagens de tilápia em diferentes idades. El-Dahlar (1997) obteve valores de proteína bruta (PB) de 18,5%, extrato etéreo (EE) de 2,7% e teor de umidade (U) de 71,3% em carcaças de tilápia-do-nilo de 250g. No trabalho de Shiau e Lin (1993) com *O. niloticus* x *O. aureus* os valores variaram de (U) de 73,4 a 76,7%, (PB) 14,5 a 14,7%, (EE) 3,9 a 8,1% e cinzas com 4,4%.

Com relação ao isolamento do probiótico, foi possível recuperar a probiótico *B. subtilis* do intestino dos peixes, demonstrando a viabilidade desta cepa de bactéria como probiótico, sendo encontrados os seguintes valores (BD - 4,12x10³ e AD - 2,84x10³ UFC.g⁻¹ de intestino). Resultados semelhantes sobre a possibilidade da recuperação no intestino foram descritos em tilápias alimentadas com probiótico e leveduras (Meurer et al., 2008, Tachibana et al., 2011). O probiótico *B. subtilis* permaneceu viável desde sua incorporação na ração e após passagem pelo estômago (resistência a proteases, sais biliares e baixo pH). Não houve crescimento de *B. subtilis* nas placas do controle.

Muitos agentes patogênicos que acometem os peixes podem causar prejuízos à integridade do epitélio intestinal (Ringø et al., 2007a,b; Salinas et al., 2008). A redução do número de possíveis agentes patogênicos presentes no trato gastrointestinal reduz os

prejuízos na mucosa acarretando em menores gastos com a manutenção para reparação dos tecidos lesionados, com isto, apresentando uma maior organização e crescimento destes tecidos. Populações de probióticos associados ao muco do intestino podem oferecer competição, produção de bacteriocinas e liberação de outros compostos antimicrobianos no muco que melhoram a função protetora da camada mucosa contra agentes patogênicos e exerce um papel imunoestimulador ao hospedeiro (Kim & Austin, 2006; Newaj-Fyzul et al., 2007). É conhecido que a microbiota intestinal de animais aquáticos pode ser manipulada, constituindo assim uma ferramenta viável a fim de reduzir ou eliminar a incidência de patógenos (Balcazar, 2002).

CONCLUSÃO

A inclusão do probiótico *B subtilis* na ração (5×10^9 UFC kg⁻¹) não influenciou o desempenho zootécnico e a composição corporal dos peixes. A elevada densidade de estocagem mostrou-se um agente estressor ocasionando redução no apetite dos peixes, com conseqüente menor crescimento dos peixes. A recuperação do probiótico no intestino foi possível, possibilitando seu uso como probiótico para tilápia-do-nilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALY, S.M.; AHMED Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A. et al. 2008 Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish immunology*. 25:128-136.
- AOAC – 1984 Association of Official Analytical Chemists, *Official methods of analysis*, 12th edn., Washington, DC p.1015.
- BALCAZAR, J.L., 2002. Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In: de Blas, I. (Ed.), *Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, Zaragoza, Spain, pp. 877–881
- BALCÁZAR, J.L., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I. et al. 2006 The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186.
- CARNEVALI O., VIVO, L. de, SULPIZIO R., GIOACCHINI G., OLIVOTTO I., SILVI S., CRESCI, A. 2006 Growth improvement by probiotic in European sea bass

juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258; 430–438.

DIAS, D. C.; LEONARDO, A. F. G. ; TACHIBANA, L. et al. 2012 Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 40-45.

EL-DAHAR, A. 1997 Effect of fish size on growth performance, body composition and feed utilization of Nile tilapia in Egypt. In: WORLD AQUACULTURE, 97, Seattle, Washington, U.S.A., 1997. *Abstracts...* Louisiana State University, Baton Rouge, LA, U.S.A., p.134.

EL-HAROUN, E.R., GODA, A.-S.A.M., CHOWDURY, M.A.K. 2006 Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac. Res.* 37, 1473–1480.

FABREGAT, T.H.; FERNANDES, J. B. K.; RODRIGUES; L.A.; CABRAL, K.E.; GARCIA, F; SAKOMURA, N.K. *Prebiótico flavofeed® como suplemento dietário para juvenis de tilapia do nilo Oreochromis niloticus*. 42f. In: *Temas Especiais em biologia Aquatica e Aquicultura II*. Ed. Piracicaba, SP 2008, v.2, p. 95-104..

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. In the Joint FAO/WHO Expert Consultation report on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2011 Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department. FAO yearbook. *Fishery and Aquaculture Statistics 2009*. Rome, p.28.

FAUCONNEAU B, ALAMI-DURANTE H, LAROCHE M et al. 1995 Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture*, 129:265-297.

GALL, G. A. E.; BAKAR, Y. 1999 Stocking density and tank size in design of breed improvement programs for body size of tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, p. 197-205.

GATESOUBE, F.J. 1999 The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p.147-165.

GOMES, L.C.; BALDISSEROTTO, B.; SENHORINI, J.A. 2000 Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. *Aquaculture*, v. 183, p. 73-81.

HISANO, H., SILVA, M. D. P., BARROS, M. M., et al. 2006 Levedura integra e derivados do seu processamento em rações para tilapia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Scientiarum*, 28: 311-318.

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

JOBLING, M. 2001 Nutrient partitioning and the influence of feed composition on body composition. In. HOULIHAN, D. et al. *Food intake in fish*. Oxford-UK: Blackwell-science. Chap.15, p.354-375.

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.

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

- MAKRIDIS, P., FJELLHEIM, A. J., SKJERMO, J., et al. 2000 Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or biencapsulated in rotifers. *Aquaculture International*, 6: 367-380.
- MARTINS, T.R., SANTOS, V.B., PERES, P.V., et al. 2009 Variação da composição química corporal de tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o crescimento. *Colloquium Vitaev* 1(2): 117-122.
- MARUTA, K. 1993 *Probióticos e seus benefícios*. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos. Anais... Santos: APINCO, p. 203-219.
- MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M.M., et al. 2008 Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9: 804-812.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). 2012 *Boletim Estatístico da pesca e aquicultura*. Brasil 2010. Brasília.
- NEWAJ-FYZUL A., ADESIYUNZ A.A., MUTANI A., et al. 2007 *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 103, 1699–1706.
- PARKER, R.B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Helath*, 29: 4-8.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M., et al. 2002 Digestibilidade Aparente de Ingredientes pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, 31(1): 595-604. 2002.
- RIDHA, M.T. 2006 Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at two stocking densities. *Aquaculture Research*, 37, 172-179. 2006.
- RINGØ, E., MYKLEBUST, R., MAYHEW, T.M., et al. 2007a Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquacult.* 268, 251–264.
- RINGØ, E., SALINAS, I., OLSEN, R.E., et al. 2007b Histological changes in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) intestine following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell Tis. Res.* 328, 109–116.
- SALINAS, I., MYKLEBUST, R., ESTEBAN, M.A., et al. 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. *Vet. Microbiol.* 128, 167–177.
- SHEARER, K.D. 1994 Factors affecting the proximal composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, v.119, p.63-88.
- SHIAU, S. Y. & LIN, S. F. 1993 Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, v. 110, p. 321 - 30.
- SILVA, L. C. R., FURUYA, W.M., NATALI, M. R. M., et al. 2010 Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.6, p.1175-1179.
- SILVA, P. C.; KRONKA, S. N.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H., et al. 2002 Desempenho produtivo da tilápia-do-nilo em diferentes densidades e trocas de água em raceway. *Acta scientiarum*. Animal science, v. 24, n. 4, p. 935-941.
- SUZER, C., COBAN, D., KAMACI, H.O., et al. 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.

- TACHIBANA, L.; DIAS, D. C.; ISHIKAWA, C. M., et al. 2011 Probiótico na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758): desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos*, 25:25-31.
- TAOKA, Y., MAEDA, H., JO, J.Y., et al. 2006 Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72, 310–321.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P., et al. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, p.655-671.
- WANG, Y.B.; TIAN, Z.Q.; YAO, J.T. et al. 2008 Effect of probiotic *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niuloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277: 203-207.

CAPITULO 2:

HEMATOLOGIA E RESPOSTA IMUNE INATA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO COM PROBIÓTICO E CRIADA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

Hematologia e resposta imune inata de tilápia-do-nilo alimentada com ração com probiótico e criada em diferentes densidades de estocagem

RESUMO

Objetivou-se avaliar os parâmetros hematológicos e a resposta imune inata de tilápia-do-nilo, alimentada com ração contendo o probiótico, *Bacillus subtilis*, e criada em diferentes densidades de estocagem durante 84 dias. Foram utilizados 520 alevinos de tilápia revertidos ($32,63 \pm 1,25$ g), distribuídos em 16 tanques de 800L, com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 , quatro repetições, nas densidades de estocagem ($18,75$ peixes m^{-3}) e ($62,50$ peixes m^{-3}). A ração com probiótico foi suplementada com $5 \cdot 10^9$ UFC de *B. subtilis* por quilo de ração. Ao final do experimento, foram retiradas amostras de sangue dos peixes para determinação dos parâmetros hematológicos e avaliação da resposta imune inata avaliando a atividade fagocítica e lisozima plasmática. Maiores valores ($p < 0,05$) foram encontradas nos níveis de lisozima e no índice fagocítico dos peixes alimentados com *B. subtilis* quando criados na maior densidade de estocagem. Os peixes que receberam a ração com probiótico, quando criados na maior densidade de estocagem apresentaram menores valores no número de eritrócitos e hematócrito, contudo os eritrócitos apresentaram maiores valores na concentração de hemoglobina corpuscular média. Não foram encontradas diferenças nos valores de cortisol e glicose mesmo quando criadas na alta densidade de estocagem. A inclusão da bactéria probiótica *B. subtilis* na concentração de 5×10^9 UFC/kg⁻¹ de ração beneficiou o sistema imune inato de tilápia-do-nilo ao estresse relacionado a maior densidade de estocagem, aumentando os níveis de lisozima plasmática e atividade fagocítica.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, imunologia, lisozima, atividade fagocítica, cortisol, glicose

INTRODUÇÃO

O uso de probióticos na aquicultura vem aumentando nos últimos anos, devido aos benefícios apresentados. Os probióticos podem estimular o crescimento, inibir o desenvolvimento de patógenos, melhorar o funcionamento do sistema imunológico e aumentar a tolerância ao estresse (Gatesoupe, 1999; Verschueren et al., 2000; Balcázar et al., 2006; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Wang et al. 2008).

Os regimes intensivos de produção aquícola podem apresentar diferentes fatores de estresse. Como resultado das variações ambientais e do estresse de manejo, ocorrem variações nas concentrações de cortisol, glicose sanguínea e nas características hematológicas responsáveis pela imunossupressão do organismo (Yada e Nakanishi, 2002). Dessa maneira, é essencial que o sistema imune do peixe funcione adequadamente a fim de manter a saúde ou higidez.

A administração de probióticos como forma de modular o sistema imunológico tem sido estudada em várias espécies de peixes. Aumentos na atividade fagocítica dos macrófagos e produção de lisozimas, pela administração de probióticos em peixes foram descritos por vários autores (Kim e Austin, 2006, Newaj-Fyzul et al., 2007, Harikrishnan et al., 2010, Geng et al., 2011).

Newaj-Fyzul et al., (2007) demonstrou que truta arco-íris (30g) recebendo 1×10^7 UFC de *B. subtilis* AB1 por grama de ração por um período de 14 dias apresentaram maiores valores de lisozima no soro e intestino, na atividade fagocítica e *burst* respiratório. Aly et al. (2008) observaram aumentos da concentração de lisozima e da atividade respiratória dos leucócitos em tilápia-do-nilo (5 ± 1.3 g) recebendo ração suplementada com (1×10^7 UFC.g⁻¹) *B. subtilis* e (1×10^7 UFC.g⁻¹) *Lactobacillus acidophilus* fornecidas separadamente e em conjunto.

As bactérias do gênero *Bacillus* podem estimular a resposta imune e serem utilizadas como imunomoduladores (Coppola e Gil-Turnes, 2004). O *B. subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e demonstrou capacidade inibitória in vitro do crescimento de *Aeromonas hydrophila* e na alimentação da tilápia-do-Nilo foi eficaz como promotor de crescimento (Aly et al., 2008).

A habilidade das bactérias probióticas em modular a imunidade e aumentar o balanço microbiano de microrganismos entéricos, oferece alternativa biologicamente efetiva para melhorar a saúde sem recorrer ao consumo de drogas alopáticas (Kailasapathy e Chin, 2000).

Desta forma, objetivou-se avaliar os parâmetros hematológicos e a resposta imune inata de tilápia-do-nylo, alimentada com ração contendo o probiótico *Bacillus subtilis*, criada em diferentes densidades de estocagem.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) /Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP durante 84 dias. Estabeleceu-se um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x2 sendo, duas densidades de estocagem e duas dietas com quatro repetições.

Foram utilizadas 520 tilápias-do-nylo, *Oreochromis niloticus* ($32,63 \pm 1,25$ g) linhagem GIFT revertidas para macho e distribuídas em 16 tanques com volume útil de 800L. Cada tanque apresentava fluxo de água ($2,5 \text{ l min}^{-1}$) e aeração contínua e individual para evitar a contaminação cruzada com as bactérias probióticas. Termostatos foram instalados em todos os tanques.

Os peixes foram estocados em duas densidades, sendo denominada baixa (18,75 peixes m⁻³) e alta densidade de estocagem (62,50 peixes m⁻³). Diariamente foram avaliados os parâmetros físico-químicos da água, oxigênio dissolvido, pH e temperatura, e semanalmente, a amônia total (Kit LabconTM). Os parâmetros da qualidade da água estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Valores médios e desvios padrões dos parâmetros da qualidade da água registrados durante o período experimental.

Densidade	Controle		Probiótico	
	BD	AD	BD	AD
Temperatura (°C)	25,2±0,5	25,1±0,5	25,0±0,4	25,0±1,0
pH	6,9±0,0	6,6±0,0	6,9±0,0	6,7±0,1
Oxigênio dissolvido (mg l ⁻¹)	6,2±0,9	5,2±1,1	6,0±0,9	5,3±1,2
Amônia (mg l ⁻¹)	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25

BD= baixa densidade 18,75 peixes m⁻³, AD=alta densidade 62,5 peixes m⁻³.

Foram preparadas duas rações experimentais, a ração controle (Tabela 2) e a ração com a inclusão da bactéria *Bacillus subtilis* na concentração de 5x10⁹ UFC por quilo de ração. Foi utilizado o probiótico CALSPORIN[®] que contém 10¹⁰ UFC de *B. subtilis* liofilizado por grama do produto. O probiótico foi pesado em balança analítica, diluído em óleo de soja (2 % da ração) e aspergido sobre a ração. A dieta controle recebeu a mesma quantidade de óleo de soja. As rações foram mantidas em temperatura de 4°C e foi fornecida três vezes ao dia *ad libitum* pelo período de 84 dias.

Ao final do período experimental dois peixes por tanque foram anestesiados em benzocaína (100 mg L⁻¹) e o sangue coletado por punção do vaso caudal com seringas heparinizadas (100 UI ml⁻¹). O plasma foi obtido por centrifugação do sangue (2000xG) durante 10 minutos e mantido a -20° C ate a utilização.

Imediatamente após a colheita, o sangue foi utilizado para determinação dos seguintes parâmetros: numero total de eritrócitos contados em câmara de Neubauer, hematócrito pelo método do microhematócrito, taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina e preparação de extensões sanguíneas coradas segundo

Rosenfeld para contagem diferencial e total de leucócitos e contagem total de trombócitos Hruby e Smith (1998).

Tabela 2. Composição da dieta experimental (base na matéria natural)

Rações	Controle	Probiótico
Ingrediente	%	%
Farelo de soja	40,5	40,5
Glúten de milho	5,86	5,86
Farinha de peixe	10	10
Milho	36,45	36,40
L-lisina	0,49	0,49
DL-metionina	0,4	0,4
Treonina	0,15	0,15
Fosfato bicálcico	3,8	3,8
Vitamina C	0,08	0,08
Suplemento vit./mineral ¹	0,25	0,25
BHT ²	0,02	0,02
Óleo de soja	2	2
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0,05
Composição químico-bromatológica da ração³		
Proteína bruta (%)	34,17	34,17
Proteína digestível (%)	27,00	27,00
Energia bruta (kcal/kg)	3.916	3.916
Energia digestível (kcal/kg)	3.042	3.042
Extrato etéreo (%)	2,47	2,47
Fibra bruta (%)	5,86	5,86
Lisina	2,25	2,25
Metionina	0,80	0,80
Treonina	1,17	1,17
Cálcio total (%)	1,50	1,50
Fósforo disponível (%)	0,70	0,70
Cinza (%)	8,85	8,85

¹ Suplemento vitamínico e mineral/kg de suplemento (Supre Mais): vitA 1200000 UI; vitD₃ 200000 UI; vitE 12000 mg; vitK₃ 2400 mg; vitB₁ 4800 mg; vitB₂ 4800 mg; vitB₆ 48000 mg; B₁₂ 4800 mg; ác. fólico 1200 mg; ác. Pantotênico 12000 mg; vitC 48 mg; biotina 48 mg; colina 65 mg; niacina 24000 mg; Fe 10000 mg; Cu 600 mg; Mn 4000 mg; Zn 6000 mg; I 20 mg; Co 2 mg e Se 20 mg.

² Butil Hidroxi Tolueno

³ Calculado segundo Pezzato et al. (2002)

A partir dos valores encontrados para hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de eritrócitos (RBC) foram calculados os índices hematimétricos conforme Wintrobe (1934): volume corpuscular médio (VCM = ((Ht x 10) / RBC)), hemoglobina

corpúscular média ($HCM = ((Hb \times 10) / RBC)$) e concentração de hemoglobina corpúscular média ($CHCM = ((Hb \times 100) / Ht)$).

A determinação do nível de cortisol plasmático foi realizada por kit ELISA (DBC kit; Diagnostics Biochem Canada, Inc., Ontario, Canada). A absorvância foi medida em leitora de microplacas em comprimento de onda de 450nm.

A glicose foi realizada por kit Labtest[®] pelo princípio da catalisação da glicose. O peróxido de hidrogênio reage sob ação catalisadora da peroxidase, formando a coloração vermelho, a qual é proporcional a concentração de glicose na amostra. A amostra foi avaliada espectrofotômetro (505nm).

A lisozima plasmática foi determinada segundo Kim & Austin (2006) modificado. Diluições seriadas de plasma foram realizadas com tampão fosfato salina (PBS 0,05M) em microplacas de 96 poços de fundo plano. A cada poço foi adicionado 100 μ L de solução de *Micrococcus lysodeikticus* (0,4mg.ml⁻¹ de PBS). As placas foram incubadas e a densidade ótica foi medida a 540 nm nos tempos 0, 5, 15 e 30 minutos. Uma unidade de lisozima foi determinada como a quantidade necessária para diminuir a absorvância em 0,001 m⁻¹.

Dois peixes de cada repetição foram utilizados para avaliação da atividade fagocítica. Após anestesia em benzocaína, três mililitros de solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foram injetados na cavidade celomática dos peixes na concentração de 11.000 células mm⁻³. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico seguido de dissecação medular e, em seguida, realizada a lavagem da cavidade celomática com três mililitros de solução salina 0,7% e o líquido aspirado com pipeta Pasteur, centrifugado a 251,5xG por cinco minutos, e o sobrenadante desprezado. Uma alíquota do sedimentado foi examinada em microscópio (400x) de contraste de fase para determinação da capacidade fagocítica (CF) e índice

fagocítico (IF) segundo Dias et al. (2012), obedecendo as seguintes fórmulas: $CF = n^{\circ}$ de fagócitos fagocitando / 100 e $IF = n^{\circ}$ total de leveduras no interior dos fagócitos / número de fagócitos fagocitando.

Os resultados foram analisados por análise de variância ANOVA e as médias comparadas por teste de Duncan, sendo as diferenças consideradas significantes quando $p < 0,05$. Sendo utilizado o software SAS (Statistical Analysis System) versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um sistema intensivo de produção, os fatores estressantes ocasionados pelo próprio cultivo se somam aos causados pelos fatores ambientais, que pode dar origem a um estresse crônico. Este estado acarreta em desequilíbrio da homeostase fisiológica, redução do crescimento e capacidade reprodutiva e supressão do sistema imune, tornando o peixe susceptível a doenças (Wendelaar-Bonga, 1997; Van Weerd e Komen, 1998). Os resultados hematológicos estão representados na tabela 3. Os parâmetros da serie eritrocitária obtidos nesse estudo estão de acordo com os encontrados para a mesma espécie por Barros et al (2009) e Martins et al (2004).

Os peixes alimentados com *B. subtilis*, quando criados na maior densidade de estocagem apresentaram menor número de eritrócitos e valor do hematócrito em relação aos outros tratamentos. Os peixes que receberam o probiótico e foram criados na maior densidade de estocagem, apresentaram uma maior ($p < 0,05$) concentração de hemoglobina (CHCM) dentro dos eritrócitos. A alimentação com o probiótico pode ter beneficiado a capacidade de transporte de oxigênio quando os peixes foram submetidos à alta densidade de estocagem.

Tabela 3: Valores médios e erros médios do eritrograma, leucograma e trombograma de tilápias do Nilo alimentadas com *B. subtilis* adicionado a ração e criadas em baixa e alta densidade de estocagem durante 84 dias.

Densidade	Controle		Probiótico	
	Baixa	Alta	Baixa	Alta
Peso médio (g)	184,27±3,36	167,84±1,18	185,67±4,57	167,24±2,66
RBC (10^6 mm^{-3})	1,41±0,19 ^a	1,30±0,14 ^{ab}	1,33±0,22 ^{ab}	1,18±0,21 ^b
Hematócrito (%)	30,81±3,59 ^a	31,43±20,9 ^a	32,31±1,38 ^a	26,56±4,32 ^b
Hemoglobina (g/dL)	8,14±0,73	7,68±0,81	7,45±0,75	7,48±1,09
VCM (μm^3)	222,37±44,1	242,33±18,0	247,63±40,69	227,76±46,05
HCM (pg)	58,31±7,27	59,34±7,86	57,03±10,40	63,56±7,63
CHCM (%)	26,67±3,46 ^{ab}	24,47±2,63 ^b	24,47±2,63 ^b	28,92±6,62 ^a
Leucócitos (mm^{-3})	49030±9253 ^a	39165±6056 ^{ab}	36760±9121 ^b	42509±8738 ^{ab}
Linfócitos (mm^{-3})	44043±7796	36732±5961	33746±8502	40229±8329
Neutrófilos (mm^{-3})	2112±838	1047±659	1586±122	817±682
Monócitos (mm^{-3})	1766±613	1183±272	1084±515	1575±592
Trombócitos (mm^{-3})	19006±5426 ^b	22609±3711 ^{ab}	28063±6597 ^a	24872±6361 ^{ab}

^{ab}Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente conforme teste de Duncan ($p < 0,05$)

Não foram observadas diferenças para os parâmetros de concentração de hemoglobina total, VCM e HCM entre os tratamentos. Dias et al. 2012 não encontraram diferenças nos parâmetros de RBC, VCM e concentração de hemoglobina em reprodutores de matrinxã recebendo dietas com *B. subtilis* e Faramarzi et al., 2011 em estudo com *Oncorhynchus mykiss* recebendo dietas com diferentes níveis de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram maiores valores de RBC e hemoglobina.

O número de leucócitos e trombócitos são considerados importantes indicadores do estado de saúde de peixes. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa e, como parte das respostas inatas, os leucócitos, após quimiotaxia até o foco lesado, são capazes de reconhecer patógenos, fagocitá-los e degradá-los. Os peixes do tratamento controle criados na baixa densidade de estocagem apresentaram maiores valores de

leucócitos ($p < 0,05$) que os peixes que receberam a ração com probiótico criados na mesma densidade. Os valores absolutos encontrados de leucócitos estão dentro da faixa de variação encontradas em estudos com a mesma espécie (Ueda et al., 1997; Tavares Dias, 2003).

Nos peixes criados na menor densidade de estocagem e alimentados com o probiótico foram observados maiores valores de trombócitos quando comparado ao controle na mesma densidade de estocagem. O consumo do probiótico pelos peixes pode ter induzido a produção de trombócitos, o que pode ser interessante, visto que, estas células possuem importante função no sistema imune (Secombes, 1996). Segundo Tavares-Dias et al. (2007) os trombócitos possuem a capacidade de realizar fagocitose, podendo ser considerados como digestores de células em peixes por sua capacidade de remover restos celulares por fagocitose.

Resultados semelhantes nos valores de trombócitos foram obtidos por Barbosa et al. (2011) que observaram maiores valores em *Centropomus parallelus*, alimentados com o probiótico *Lactobacillus plantarum*. Jatoba et al. (2008) observaram que tilápias alimentadas com ração com bactérias ácidos lácticas e infeccionadas com o patógeno *Enterococcus durans* apresentaram maiores valores de trombócitos circulantes quando comparado com ao tratamento controle também infeccionado.

A lisozima é uma proteína lítica de grande importância para o sistema de defesa inespecífico, por causar a lise nas paredes celulares de bactérias gram-positivas (Lie et al., 1989; Ellis, 1990; Paulsen et al., 2003). Os peixes alimentados com a ração com probiótico quando criados na alta densidade de estocagem apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) de lisozima que o controle na mesma densidade (Figura 1). Os peixes do controle mantidos em alta densidade apresentaram os menores valores de lisozima entre os tratamentos, a menor produção de lisozima das tilápias do tratamento controle criada

na maior densidade de estocagem, pode estar relacionada a uma imunossupressão devido a exposição dos peixes a um longo período na situação de estresse pelo adensamento.

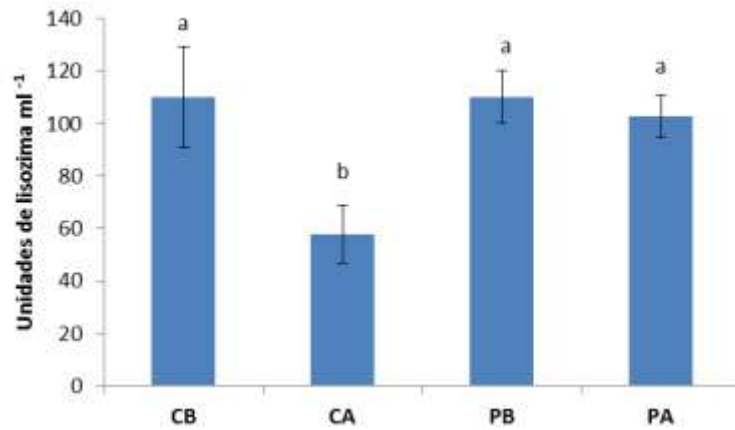


Figura 1: Valores médios e erro padrão dos níveis de lisozima de tilápias do Nilo alimentadas com *B. subtilis* em diferentes densidades durante 84 dias. CB = controle baixa densidade, CA = controle alta densidade, PB = Probiótico baixa densidade e PA = probiótico alta densidade. ^{ab} Letras iguais não diferem significativamente conforme teste de Duncan ($p < 0,05$).

Maiores valores de lisozima foram observados em peixes que receberam ração suplementada com probióticos (Panigrahi et al., 2004, Kim e Austin, 2006, Aly et al., 2008). Newaj-Fyzul et al., (2007) observaram que truta arco-íris recebendo ração contendo 1×10^7 UFC de *B. subtilis* AB1 por grama de ração por um período de 14 dias apresentaram maiores valores de lisozima, na atividade fagocítica e *burst* respiratório.

As células fagocíticas desempenham um importante papel na regulação do sistema imune inato, pois são capazes de reconhecer patógenos e materiais estranhos e degradá-los pelo processo de fagocitose (Secombes, 1990; Steinhagen e Jendrysek, 1994). Os peixes que receberam o probiótico e criados na maior densidade de estocagem apresentaram maiores valores no índice fagocítico ($p < 0,05$) quando comparados aos outros tratamentos (Figura 2).

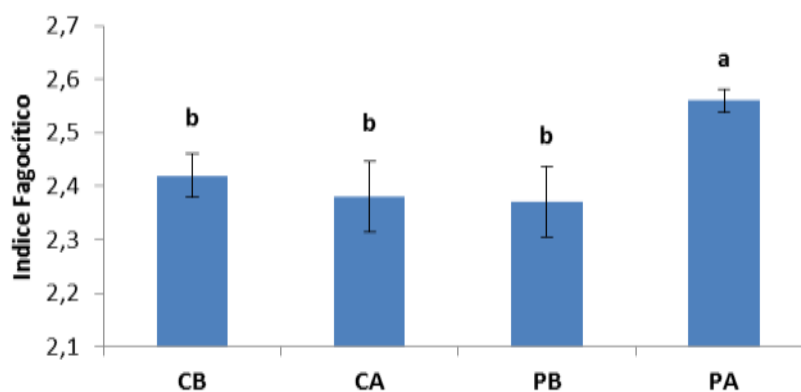


Figura 2: Valores médios e erro padrão do índice fagocítico de tilápias do Nilo alimentados com *B. subtilis* em diferentes densidades durante 84 dias. CB = controle e baixa densidade, CA = controle e alta densidade, PB = probiótico e baixa densidade, PA = probiótico e alta densidade. ^{ab} Letras iguais não diferem significativamente conforme teste de Duncan ($p < 0,05$)

As altas densidades de estocagem podem favorecer a rápida disseminação de patógenos devido a maior facilidade de contato e proximidade entre os animais, bem como pelo maior acúmulo de resíduos orgânicos. O aumento do índice fagocítico observado nos peixes alimentados com o probiótico na maior densidade de estocagem, mostrou-se como uma ferramenta de adaptação dos peixes para superar os desafios impostos pela situação.

Não foram observadas diferenças estatísticas na capacidade fagocítica entre os tratamentos, contudo observou-se que os animais que receberam o probiótico apresentaram maiores valores nas duas densidades de estocagem (BD - 86,83% e AD - 87,31%) quando comparadas ao controle (BD - 84,80% e AD - 84,10%).

Mudanças nos níveis de catecolaminas, hormônios corticosteróides e nutrientes no sangue podem ser utilizados para monitorar respostas ao estresse (Barton e Iwama, 1991). Não foram encontradas diferenças entre nos níveis de cortisol e glicose das tilápias, mesmo quando criadas em diferentes densidades de estocagem. Os valores de cortisol obtidos foram para o controle (BD - 15,15 e AD - 19,28 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e probiótico

(BD – 16,56 e AD – 17,31 $\mu\text{g ml}^{-1}$), e os valores de glicose encontrados no controle (BD – 45,31 e AD – 45,00 mg dl^{-1}) e probiótico (BD – 53,02 e AD – 48,67 mg dl^{-1}).

Em experimentos com peixes submetidos a situações de estresse crônico os níveis de cortisol e glicose pode apresentar um pequeno aumento ou mesmo não se alterar (Rotllant e Tort 1997, Barton et al., 2005, Davis Jr. e McEntire, 2006, Fast et al., 2008), possivelmente ocasionado pela supressão do sistema endócrino como resultado pelo prolongado período em situação de estresse (Hontela et al., 1992), ou uma habituação do animal a esta condição. Algumas vezes não podem ser notadas mudanças no nível de glicose plasmática, pois sobre ação de estresse o peixe rapidamente consome suas reservas energéticas a fim de manter a homeostase (Martínez-Porchas et al., 2009).

CONCLUSÃO

A inclusão da bactéria probiótica *B. subtilis* na concentração de 5×10^9 UFC kg^{-1} de ração para tilápia-do-nilo beneficiou a resposta do sistema imune aumentando os valores de lisozima plasmática, do índice fagocítico e a concentração de hemoglobina corpuscular média dos peixes criados na maior densidade de estocagem. Não foram observadas alterações nas concentrações de cortisol e glicose no sangue dos peixes, mesmo quando criada em alta densidade de estocagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, E.G. et al (2002). Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v. 133, p. 375-382.
- BALCÁZAR, J.L., DE BLAS, I., RUÍZ-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., GUIMARAES, I. G. (2009). Hematological response and growth performance of Nile Tilapia fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, 40: 895-903,
- BARTON, B. A., RIBAS, L., ACERETE, L. & TORT, L. (2005). Effects of chronic confinement on physiological responses of the juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* to acute handling. *Aquaculture Research*, 36: 172-179.
- BARTON, B.A. & IWAMA, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review Fish Disease*, Vancouver, 10: 3-26.
- CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. (2009). Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: Tavares-Dias, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 361-388.
- CHEN, R.G.; LOCHMANN, R.T.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.J. (2004). Effects of dietary vitamin C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, v.242, p.553-569.
- CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. (2008). Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 11: 445–462.
- COLLIER, H.B. (1944). The standardizations of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.*, Ottawa, v. 50, n. p. 550-552.
- 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. *Mem. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 20, p. 329-334.
- Coppola, M.M., Gil-Turnes, C. (2004). Efeito de probiótico na resposta imune. *Ciência Rural*, 34 (4): 1297-1303.
- DIAS, D. C.; LEONARDO, A. F. G. ; TACHIBANA, L. et al. (2012). Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 40-45.
- ELLIS, A.E. (1990) Serum antiproteases in fish. In *Techniques in Fish Immunology* ed. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P. and Roberson, B.S. pp. 95–99. Fair Haven, NJ: SOS Publications.
- FARAMARZI, M.; KIAALVANDI, S.; LASHKARBOLOOKI, M.; IRANSHAHI, F. (2011). The investigations of *Lactobacillus acidophilus* as probiotics on grown performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American – Eurasian Journal of Scientific Research*, 6(1): 32-38.
- FAST, M.D, HOSOYA, S., JOHNSON, S.C., AFONSO, L.O. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol.*; 24(2):194-204.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. In the Joint FAO/WHO *Expert Consultation report on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*.
- GALL, G. A. E.; BAKAR, Y. (1999). Stocking density and tank size in design of breed improvement programs for body size of tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 173, p. 197-205.
- GATESOUBE, F.J., (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- GENG X, DONG XH, TAN BP, YANG QH, CHI SY, LIU HY, LIU XQ. (2011). Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol.*; 31(3):400-6.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. (1971). Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *Am. J. Clin. Pathol.*, Hagerstawn, v. 56, n. 1, p. 35-39.
- GOMES, L.C., BRINN, R.P., MARCON, J.L., DANTAS, L.A., BRANDAO, F.R., ABREU, J.S., MCCOMB, D.M., BALDISEROTTO, B., (2008). Using Efinol®L during transportation of Marbled hatchetfish, *Carnegiella strigata* (Günther). *Aquaculture Research* 39, 1292–1298.
- GOMES, L.C., BRINN, R.P., MARCON, J.L., DANTAS, L.A., BRANDAO, F.R., ABREU, J.S., LEMOS, P.E., MCCOMB, D.M., BALDISEROTTO, B. (2009). The benefits of using Efinol® during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) in the Amazon. *Aquaculture Research* 40, 157–165
- GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. (2003). Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquac. Soc.*, Stoneville, 34 (1): 76-84
- GOMES,L.C.; BALDISEROTTO,B.; SENHORINI,J.A. (2000). Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. *Aquaculture*, v. 183, p. 73-81.
- HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., HEO, M. (2010) Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 29, pp. 868–874.
- HONTELA, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones. *Reviews in Toxicology*, 1: 1-46.
- HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. (1996) The nature of hematological response in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, 15 (4): 339-347.
- HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. (1998). Hematology of fish, p. 1120-1125. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Ed.). *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Blackburg: Wiley-Blackwell.
- JENTOFT, S., AASTVEIT, A. H., TORJESEN, P. A. & ANDERSEN, Ø. (2005). Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*,141:353-358.
- KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immun. Cell Biol.*78,80–88.

- 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.
- KIM D.H, AUSTIN B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol*; 21:513-24.
- LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A., FROYSADAL, E. (1989). Study of lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 1-5.
- LIU, K.F., CHIU, C.H., SHIU, Y.L., CHENG, W., LIU, C.H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 837-844.
- MARTÍNEZ-PORCHAS, M., MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. & RAMOS-ENRIQUEZ, R. (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2): 158-178.
- 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 swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, 33(1):5-10.
- NARNAWARE, Y.; BAKER, B.I.; TOMLINSON, M.G. (1994). The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.31-40.
- NEWAJ-FYZUL A., ADESIYUNZ A.A., MUTANI A., RAMSUDHAG, BRUNT J. & AUSTIN B. (2007) *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 103, 1699–1706.
- OOHARA, I.; AKIYAMA, T.; AONO, H. (1991). Distribution and interorganic correlations of lysozyme activity in the juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacul.*, v.19, p.17-26.
- PANIGRAHI, A., KIRON, V., KOBAYASHI, T., PUANGKAEW, J., SATOH, S., SUGITA, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotics bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 379–388.
- PARKER R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*; 29:4-8.
- PAULSEN, S. M., LUNDE, H., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. (2003). *In vivo* effects of glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 39-54.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M., et al. 2002 Digestibilidade Aparente de Ingredientes pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, 31(1): 595-604. 2002.
- RANZANI-PAIVA M.J. & SILVA-SOUZA A.T. (2004). Hematologia de Peixes Brasileiros. In: *Sanidade de Organismos Aquaticos* (ed. By M.J. Ranzani-Paiva, R.M.Takemoto &M.A.P. Lizama), p. 89-120.Varela Publishing, Sao Paulo, Brazil.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; EIRAS, A. C.; SILVEIRA, V. R. (2004). Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the

- blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 47: 945-953.
- RIDHA, M.T. (2006). Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. *Aquaculture Research*, 37, 172-179.
- ROLLO A, SULPIZIO R, NARDI M, SILVI S, ORPIANESI C, CAGGIANO M, et al. (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiol Biochem*, 32:167-177.
- ROSENFELD, G. (1947). Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantã*, 20: 315-328.
- ROTLLANT, J. & TORT, L. (1997). Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 51: 21–28.
- SECOMBES, C.J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven: SOS Publications, p.137-154.
- SECOMBES, C.J., HARDIE, L.J., DANIELS, G. (1996). Citokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immun*, 6, 329 – 34.
- SILVA P.C., KRONKA S.N., SIPAÚBA-TAVARES L.H. E SOUZA V.L. (2002). Desempenho produtivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) em diferentes densidades e trocas de água em “raceways. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 4, p. 935-941.
- SILVA, J.R.M.C., PORTO-NETO, L.R., BORGES J.C.S., JENSCH-JUNIOR B.E. (2005). Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, 28 (4): 326-328.
- SILVA, J.R.M.C., STAINES, N.A., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., PORTO-NETO, L.R., BORGES J.C.S. (2002). Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology*, 60: 466-478.
- SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.41, p.125-139.
- SOPINSKA, A. (1984). Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns.III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. *Acta Ichthyol. Pisc.*, Szczecin, 15: 141-165.
- STEINHAGEN D, AND JENDRYSEK, S.(1994). Phagocytosis by carp granulocytes;in vivo and in vitro observations. *Fish Shellfish Immunol* 4.521-524.
- SUZUKI, Y.; IIDA, T. (1992). Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.149-160.
- TAOKA Y, MAEDA H, JO JY, JEON MJ, BAI SC, LEE WJ, et al. (2009). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Sci*, 72:310-321
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. (2003). Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturadas em “pesqueague”de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 107-114.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES,F.R.; CARNEIRO, P.C.F. (2001) Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 27 (1): 43-48.

- UEDA, I. K., EGAMI, M. I., SASSO, W. S., MATUSHIMA, E. R. (1997). Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 34: 270-275.
- URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. (2004). Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva. In Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Castagnolli, N. (Eds.). *Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical*. Editora TecArt. p. 171-193
- VAN-WEERD, J.H.; KOMEN, J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.120, p.107-112.
- VARELA J.L., RUÍZ-JARABO I, VARGAS-CHACOFF L, ARIJO S, LEÓN RUBIO JM, GARCÍA MILLÁN I, MARTÍN DEL RÍO MP, MORIÑIGO MA, MANCERA JM. (2010). Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 265-271.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (1997). The effect of vitamin C on fish health. Brochure nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland.
- SUZUKI, Y.; IIDA, T. (1992). Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annu. Rev. Fish Dis.*, v.2, p.149-160. 1992.
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 651–671.
- WANG, Y.-B., LI, J.-R., LIN, J. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 281, 1–4.
- WEDEMEYER, G. A. (1997). Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. United Kingdom: Cambridge University Press, p. 35-71.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v.77, p.591-625.
- WINTROBE, M.M. (1934). Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Leipzig, v.51, p.32-49.
- WOOD, C. M., WALSH, P. J., THOMAS, S. & PERRY, S.F. (1990). Control of red blood cell metabolism in rainbow trout after exhaustive exercise. *Journal of Experimental Biology*, 154: 491-507.
- YADA, T. E NAKANISHI, T. (2002). Interaction between endocrine and immune system in fish. *Int. Rev. Cytol.*, 220: 35-92.
- YOSHINAGA, K.; OKAMOTO, N.; KURATA, O.; IKEDA, Y. (1994). Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.*, v.29, p.1-4.
- YOUNG, P.S. E CECH, J.J.JR. (1993). Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Ottawa, 50 (10): 2094-2099.
- YOUSIF, A.N.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. (1991). Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.*, v.10, p.45-49.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a intensificação da piscicultura, principalmente nos sistemas de tanque rede, maiores densidades de estocagem vêm sendo frequentemente utilizado a fim de garantir uma maior produtividade. Contudo, o manejo relacionado a alta densidade de estocagem pode suprimir o sistema imunológico do animal deixando-o susceptível a doenças. Em busca de uma sociedade sustentável o uso de antibióticos vem sendo abolido, principalmente pelo mercado consumidor, que deseja alimentos de qualidade, saudáveis do ponto de vista sanitário, isentos de resíduos químicos, produzidos com menor uso de insumos sintéticos e com a preocupação com a conservação do meio ambiente e a biodiversidade. Algumas alternativas ao uso de antibióticos estão sendo utilizadas, como os probióticos.

No presente estudo os peixes que receberam a dieta com inclusão do probiótico, *Bacillus subtilis*, não apresentaram diferenças no desempenho zootécnico, contudo, a resposta imune foi influenciada positivamente apresentando maiores níveis de lisozima plasmática e maior atividade fagocítica quando criados na maior densidade de estocagem.

As observações realizadas no presente estudo, demonstram que a suplementação da dieta de tilápia-do-nilo com o probiótico, *Bacillus subtilis*, pode ser uma alternativa eficiente a fim de garantir uma melhor resposta imune dos peixes quando expostos a maior densidade de estocagem.

Apesar dos resultados descritos no estudo, novos experimentos são necessários para levar tais resultados ao nível produtivo como a experimentação a campo, dosagens utilizadas, tempo de fornecimento (contínuo ou esquema de pulsos), bem como nos parâmetros produtivos que apresentam resultados controversos em diversos trabalhos.