

INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA DIETA PARA JUVENIS DE TILÁPIAS-DO-NILO: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS*

Ivan Bernardoni NAKANDAKARE ¹; Marina Keiko Pieroni IWASHITA ²; Danielle de Carla DIAS³; Leonardo TACHIBANA ⁴; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA ⁴; Elizabeth ROMAGOSA ⁴

RESUMO

Probióticos são, em geral, considerados microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. O método de processamento da dieta e a forma de inclusão do probiótico podem interferir nos parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos dos peixes. Objetivou-se estimar os parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos em juvenis de tilápia-do-nylo, alimentados com probiótico incluído antes e após o processamento de peletização e extrusão da ração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos: ração peletizada sem a inclusão do probiótico, ração peletizada com inclusão do probiótico antes e após o processamento, ração extrusada sem probiótico e ração extrusada com inclusão do probiótico após o processamento, e cinco réplicas. Duzentos e cinquenta peixes foram distribuídos em 25 aquários (20 L) e alimentados durante 63 dias. A composição sanguínea (série vermelha e branca) não mostrou diferenças significativas, exceto a concentração de hemoglobina corpuscular média do controle quando comparados aos demais tratamentos. A capacidade fagocítica dos animais que receberam a dieta extrusada suplementada com probiótico foi significativamente superior, entretanto, para o índice fagocítico, não ocorreram diferenças entre os tratamentos. Os peixes alimentados com a dieta extrusada mostraram melhora na imunidade inespecífica. As bactérias probióticas colonizaram o intestino, pois foi possível recuperá-las. Pode-se afirmar que esses peixes mantiveram-se sadios, pois os parâmetros hematológicos não sofreram alterações durante o período experimental. O estudo revela que qualquer forma de inclusão de probióticos nas rações testadas (antes ou depois da peletização e após a extrusão) pode ser utilizada facilmente pelo piscicultor.

Palavras chave: *Bacillus subtilis*; *Bacillus toyoi*; ciclídeo; migração de macrófagos

INCORPORATION OF PROBIOTICS IN THE DIET FOR JUVENILE NILE TILAPIAS: HEMATOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS

ABSTRACT

Probiotics are generally considered as live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host. The processing method of diet and the form of inclusion of probiotic can interfere in hematological, immunological and microbiological parameters in fish. The aim was to estimate the hematological, immunological and microbiological parameters in juveniles of Nile tilapia, fed probiotic, included before and after the process of pelletization and extrusion. The experimental design was completely randomized, with five treatments: pelleted diet without probiotic, pelleted diet with inclusion of probiotic before and after processing, extruded feed without probiotic and extruded feed with inclusion of probiotic after processing and five replications. Two hundred and fifty fish were distributed in 25 aquaria (20 L) and fed for 63 days. The blood composition (red and white) showed no significant differences

Artigo Científico: Recebido em 31/08/2012 – Aprovado em 29/05/2013

¹ Pós-graduação do Instituto de Pesca, APTA/SAA/SP. e-mail: ibernak@yahoo.com.br

² Pós-graduação do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – CEP: 14.884-900 – Jaboicabal – SP – Brasil. e-mail: marina_keiko@yahoo.com.br

³ Pós-doutoranda do Instituto de Pesca, APTA/SAA/SP. e-mail: daniellebio2004@yahoo.com.br;

⁴ Pesquisadores Científicos do Instituto de Pesca, APTA/SAA/SP. e-mail: ltachiba@gmail.com; mase@pesca.sp.gov.br; e.romagosa@uol.com.br (autora correspondente)

Endereço/Address: Instituto de Pesca, APTA/SAA/SP. Av. Francisco Matarazzo, 455 – Caixa Postal 61070 – CEP: 05.001-900 – São Paulo – SP – Brasil

* Apoio financeiro: FAPESP (processo nº 01530-8; bolsa de mestrado)

except mean corpuscular hemoglobin concentration of control when compared to other treatments. The phagocytic capacity of the animals that had received the extruded diet supplemented with probiotic was significantly higher when compared to the other treatments. However, there were no differences between the treatments regarding to the phagocytic index. Fish fed the extruded diet exhibited significant improvement in the nonspecific immunity. The probiotic bacteria colonized the intestine, since it was possible to recover them. We can affirm that these fishes remained healthy, because the hematological parameters were not altered during the experimental. The study shows that any form type of inclusion in the feed tested (before or after and after pelletizing extrusion) may be easily used by the fish farmer.

Keywords: *Bacillus subtilis*; *Bacillus toyoi*; cichlid; macrophage migration

INTRODUÇÃO

Os probióticos foram definidos por FULLER (1989) como "microrganismo vivo suplementado na dieta o qual beneficia o animal hospedeiro por melhorar o balanço microbiano intestinal". Em outubro de 2001, a FAO/OMS (FAO/WHO, 2001), intitulou o termo probiótico como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro". Recentemente, NAYAK (2010) afirmou que um probiótico ideal, independente da fonte, deve ser capaz de colonizar, estabelecer e se multiplicar no intestino do hospedeiro.

Os produtos mais utilizados na indústria da aquicultura incluem uma vasta gama de probióticos, como as bactérias Gram positivas, especialmente bactérias ácido lácticas, *Bacillus*, *Streptococcus* spp, as bactérias Gram negativas *Aeromonas*, *Alteromonas*, bifidobactérias, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, e as leveduras *Saccharomyces*, *Debaryomyces* (IRIANTO e AUSTIN, 2002; BURR *et al.*, 2005; SAHU *et al.*, 2008; KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008). Em peixes, são administrados oralmente e a suplementação é feita, em geral, nas rações (NAGESWARA e BABU, 2006; SAHU *et al.*, 2008; MOURIÑO *et al.*, 2012).

Os efeitos benéficos incluem competição por sítios de adesão e resistência à colonização; competição por nutrientes essenciais; produção de compostos antagonistas contra-patógenos; evolução da resposta imune e resistência às doenças; melhoria da digestibilidade do alimento e desempenho produtivo (RINGO e GATESOUBE, 1998; VERSCHUERE *et al.*, 2000; BALCÁZAR *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2008; KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008).

No mercado existem formas distintas de comercialização dos probióticos, emulsões líquidas, liofilizadas, liofilizadas-protetidas por microencapsulação. No entanto, nenhuma bactéria probiótica comercial suporta o processamento da ração em temperaturas de 130-150 °C (extrusão), combinado com alta pressão (30 a 60 atm) (VIEIRA *et al.*, 2005). Os probióticos mais resistentes são as bactérias com a capacidade de esporulação, como os *Bacillus*, que resistem até temperaturas de 90 °C (SETLOW, 2006). Portanto, nos dias de hoje não existe a possibilidade de inclusão dos probióticos na ração antes do processo de extrusão convencional. Segundo FURUYA *et al.* (2012) estudos sobre prebióticos e probióticos em rações para tilápia ainda são incipientes.

A inclusão do probiótico na ração de peixes pode ser realizada misturando-se o pó (probiótico liofilizado) na ração farelada/triturada para alimentação das larvas e pós-larvas, antes ou após a peletização, pois o processamento da ração por este método geralmente não atinge temperaturas superiores a 60 °C. No entanto, a maioria das criações comerciais de peixes utiliza a ração extrusada e a incorporação de probiótico em grandes quantidades de ração torna-se custosa e difícil. Algumas formas para incluir o probiótico em rações extrusadas seria aplicá-lo sobre os peletes e recobri-lo com óleo para agregação (DIAS *et al.*, 2012); aspergindo o probiótico em solução com água e secando posteriormente, em temperatura de 25 °C (BUCIO *et al.*, 2005); aspergir o probiótico em emulsão com óleos (CHANG e LIU, 2002); juntamente com alginato de sódio (TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010). Todas estas formas de inclusão necessitam de cuidado, pois são organismos vivos ou viáveis que, para desempenhar as funções de probiótico, precisam

manter-se ativas no intestino para a colonização do hospedeiro (NAYAK, 2010).

A avaliação das condições fisiológicas e o estado nutricional dos peixes podem ser determinados por meio da hematologia como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2005). Segundo NAYAK (2010), bactérias probióticas podem aumentar os eritrócitos, leucócitos (linfócitos e monócitos) e atividade fagocítica em peixes, efeito da imunoestimulação (WELKER e LIM, 2011). A manipulação da microbiota intestinal por meio da suplementação dietética é uma nova abordagem, não só do ponto de vista nutricional, mas também, como uma modalidade terapêutica alternativa viável para superar os efeitos adversos dos antibióticos e drogas (CROSS, 2002).

A estimulação do sistema imune pela utilização de cepas probióticas foi reportada por GILL *et al.* (2000); RENGIPAT *et al.* (2000); SELVIN *et al.* (2004); GULLIAN *et al.* (2004); MERRIFIELD *et al.* (2010) e MOURIÑO *et al.* (2012) como uma característica a ser considerada na seleção de bactérias. A imunoestimulação é uma alternativa para manter o sistema de defesa ativo, aumentando a resistência a vírus, ou controlando populações bacterianas patogênicas que podem afetar a saúde do hospedeiro.

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

O objetivo foi avaliar as formas de inclusão do probiótico (PAS TR®) no processamento de ração e as alterações nos parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, quando mantidos em condições laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do

Instituto de Pesca, APTA, S.A.A., São Paulo-SP, Brasil. Mil juvenis de tilápias-do-nilo revertidos (lote 100% machos), pertencentes à variedade GIFT, foram acondicionados em dois tanques de 500 L cada.

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

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

Estabeleceu-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e cinco réplicas, totalizando 25 parcelas, e a unidade experimental composta de 10 peixes. Os tratamentos foram: ração peletizada sem probiótico (PEL), ração peletizada com inclusão do probiótico antes (PEL-PRÉ) e após o processamento (PEL-PÓS), ração extrusada sem probiótico (EXT) e ração extrusada com inclusão do probiótico após o processamento (EXT-PÓS). A adição de probiótico antes da extrusão não foi testada pelo fato de que nenhuma bactéria probiótica suporta o processamento da ração em temperaturas de 130-150 °C (extrusão), combinado com alta pressão (30 a 60 atm.) (VIEIRA *et al.*, 2005).

Quatro gramas, por quilo de ração, do probiótico PAS TR® (*Bacillus toyoi* $4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹ e *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹) foram utilizadas no tratamento PEL-PRÉ, adicionado à dieta antes da peletização. Para os outros dois tratamentos, PEL-PÓS e EXT-PÓS utilizaram-se também $4,0$ g kg⁻¹ de probiótico homogeneizado em 2% de óleo de soja, aspergido sobre a ração.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal/LANA da UNESP, Jaboticabal, SP, segundo os seguintes procedimentos da AOAC (1990): Matéria Seca (MS): após a pré-secagem - 65°C/72 h e secagem em estufa - 105°C/24 h, até peso constante; Extrato Etéreo (EE): lavagem da amostra com solvente (éter) - Soxhlet; Fibra Bruta (FB): tratamento da amostra com solução ácida e, em seguida, com solução básica; Proteína Bruta (PB):

análise do nitrogênio total da amostra pelo método de Kjeldahl; Matéria Mineral (MM): incineração da amostra - 600 °C/4 h; e Energia Bruta (EB): através de bomba calorimétrica.

A composição basal detalhada da ração para os juvenis de tilápia-do-nylo encontra-se na Tabela 1. As rações foram formuladas com base nos dados apresentados no NRC (1993).

Tabela 1. Composição química e análise centesimal da ração basal.

Ingredientes (%)	Dieta Basal	
	Sem Probiótico	Com Probiótico
Farelo de Soja	45,10	45,10
Farelo de Trigo	21,24	21,24
Fubá de Milho	10,45	10,05
Farinha de Peixe	10,00	10,00
Glúten de Milho	4,00	4,00
Fosfato Bicálcico	3,80	3,80
Premix Vitamínico e Mineral	0,50	0,50
L - Lisina	0,40	0,40
DL - Metionina	0,41	0,41
Vitamina C	0,08	0,08
BHT	0,02	0,02
Probiótico	0,00	0,40
Total	100,00	100,00
Composição química		
Matéria Seca (%)		86,52
Proteína Bruta (%)		36,00
Extrato Etéreo (%)		4,58
Fibra Bruta (%)		8,43
Matéria Mineral (%)		13,48
Energia Bruta (kcal kg ⁻¹)		3.524,00

Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais formuladas, peletizada e extrusada, com 36% de proteína bruta (PB), três vezes ao dia (KUBITZA, 1999), às 08h, 14h e 18h, na proporção de 1,0% do peso vivo, por 63 dias.

Para as avaliações hematológicas, a cada 21 dias foram coletadas amostras de sangue de 10 peixes por tratamento, anestesiados individualmente, segundo o COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, COBEA (<http://www.cobea.org.br>), em solução aquosa de benzocaina 1,0 g 10 L⁻¹, até a perda do equilíbrio e redução dos movimentos operculares (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). Coletou-se sangue, por meio de punção da veia caudal com seringas heparinizadas, e confeccionaram-se extensões sanguíneas, posteriormente coradas por

May-Grünwald-Giemsa, segundo método de ROSENFELD (1947), para realizar a contagem total e diferencial de leucócitos e de trombócitos (HRUBEC e SMITH, 1998).

Determinou-se o número total de eritrócitos (Er), por meio de contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se diluente de Hayen; o porcentual de hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito; e a taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina. Com os resultados obtidos, calcularam-se os índices hematimétricos como: volume corpuscular médio ($VCM = Ht \times 100/n^{\circ} \text{eritrócitos} = fL$), hemoglobina corpuscular média ($HCM = \text{taxa Hb} \times 10/n^{\circ} \text{eritrócitos} = \mu\mu g$) e concentração de hemoglobina corpuscular média ($CHCM = \text{taxa HCM} \times 100/Ht = \%$).

Ao final do experimento, um animal de cada repetição, perfazendo um total de cinco peixes de cada tratamento, foi utilizado para realizar os testes imunológicos. Injetou-se 1 mL de solução contendo leveduras, *Sacharomyces cerevisiae*, na concentração de 8.000 células mm⁻³ na cavidade celomática. Após o período de 4 h de incubação, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (1g L⁻¹) e eutanasiados por secção da medula espinhal. Foi feito um corte ventral, por onde foi realizado o lavado da cavidade peritoneal com 1 mL de solução salina a 0,65%. O líquido contendo as células fagocíticas (macrófagos) foi aspirado com pipeta Pasteur e centrifugado a 1.500 rpm (251,5 x g) por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o restante depositado entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio de contraste de fase (400 X) para contagem do número de fagócitos (TACHIBANA *et al.*, 2011). Com o número de macrófagos e o total de leveduras no interior das células fagocíticas, foram calculados os valores de Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF), segundo metodologia preconizada por SILVA *et al.* (2002; 2005): CF = número de fagócitos fagocitando/100 fagócitos e IF = número total de leveduras fagocitadas/número de fagócitos fagocitando.

Para o cultivo bacteriano, foram coletados, a cada 21 dias, o trato intestinal de cinco indivíduos por tratamento, eutanasiados. Foi feita assepsia do local do corte com álcool 70% G.L. e dos instrumentos cirúrgicos e o intestino foi separado em placa de Petri esterilizada. O intestino foi fragmentado, acondicionado em tubos de ensaio e pesado com auxílio de balança analítica. Após a pesagem, os fragmentos dos intestinos foram macerados em tubos de ensaio previamente esterilizados, diluídos em séries de 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴, homogeneizados por vórtex (ISHIKAWA, 1998) e semeados, em duplicata, em placas de Petri estéreis contendo meio de cultura TSA (Agar Trypticaseína de Soja) (IRIANTO e AUSTIN, 2002). As análises microbiológicas da ração foram realizadas na IMEVE S/A (Jaboticabal-SP). Um grama de ração de cada tratamento foi moído e diluído em 9,0 mL de água estéril, utilizando-se a mesma metodologia anteriormente citada, no entanto, com diluições seriadas de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸. As placas provenientes do

intestino e ração foram incubadas em estufa a 30 °C, por 72 h, para posterior contagem das colônias de *Bacillus* spp. (TACHIBANA *et al.*, 2011). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

Os dados dos parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos dos diferentes tratamentos foram submetidos ao teste de Bartlett's para verificar a homogeneidade dos dados, à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (ZAR, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros hematológicos são considerados indicadores da saúde dos animais em geral, incluindo-se os peixes (CHEN *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2004; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004; ISHIKAWA *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2009; HARIKRISHNAN *et al.*, 2010).

Durante os 21 dias, correspondentes à 1ª biometria, os valores médios de Hb, VCM e HCM não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2). O Ht dos animais do tratamento PEL apresentaram valores menores que o PEL-PÓS, sugerindo que o probiótico adicionado após o processamento parece atuar sobre este parâmetro quando incorporado na ração peletizada. Os valores inferiores do Ht no tratamento PEL podem ter ocorrido devido ao estresse durante a adaptação dos peixes ao espaço restrito e pequenos volumes de água. AL-DOHAIL *et al.* (2011) observaram reduções nos valores de Ht e CHCM do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, quando infectados com bactérias patogênicas, entretanto, quando receberam dietas com probióticos, os valores se mantiveram próximos aos obtidos nos peixes do controle (não-infectados).

Nas condições experimentais, somente o tratamento PEL propiciou alteração nos valores de CHCM em relação aos demais tratamentos (Tabela 2). LARA-FLORES *et al.* (2002) testaram probiótico comercial contendo uma mescla de bactérias de *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* para tilápia-do-nilo e constataram que os parâmetros da série vermelha não sofreram variações ao longo do estudo.

Tabela 2. Médias \pm erro padrão dos parâmetros hematológicos e hematimétricos em juvenis de tilápia-donilo nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Aos 21 dias					
	Ht	Hb	Er	VCM	HCM	CHCM
PEL	19,64 \pm 1,21 ^a	6,57 \pm 0,43 ^a	151,00 \pm 9,17 ^a	132,65 \pm 13,00 ^a	44,65 \pm 5,06 ^a	33,48 \pm 1,08 ^a
PEL-PRÉ	25,30 \pm 1,74 ^{ab}	6,46 \pm 0,83 ^a	183,20 \pm 6,86 ^a	137,50 \pm 4,77 ^a	34,77 \pm 3,30 ^a	25,09 \pm 1,61 ^b
PEL-PÓS	30,70 \pm 1,41 ^b	8,47 \pm 0,10 ^a	186,20 \pm 20,08 ^a	172,32 \pm 17,51 ^a	48,48 \pm 7,06 ^a	27,80 \pm 1,24 ^b
EXT	26,13 \pm 3,34 ^{ab}	6,72 \pm 0,88 ^a	169,13 \pm 27,16 ^a	157,25 \pm 9,89 ^a	40,37 \pm 2,25 ^a	25,71 \pm 0,32 ^b
EXT-PÓS	28,60 \pm 2,58 ^b	7,22 \pm 0,60 ^a	182,90 \pm 15,04 ^a	156,03 \pm 4,66 ^a	39,49 \pm 1,38 ^a	25,32 \pm 0,65 ^b
Aos 42 dias						
PEL	31,30 \pm 2,18 ^a	8,19 \pm 0,29 ^a	244,60 \pm 13,66 ^a	129,06 \pm 9,29 ^a	33,83 \pm 1,90 ^a	26,40 \pm 0,92 ^a
PEL-PRÉ	27,30 \pm 3,36 ^a	8,24 \pm 0,46 ^a	203,60 \pm 9,28 ^{ab}	135,67 \pm 19,07 ^a	40,78 \pm 2,99 ^a	31,44 \pm 2,97 ^a
PEL-PÓS	26,70 \pm 1,20 ^a	7,40 \pm 0,67 ^a	179,60 \pm 10,13 ^b	150,49 \pm 10,92 ^a	41,18 \pm 3,07 ^a	27,64 \pm 2,06 ^a
EXT	30,80 \pm 2,92 ^a	8,40 \pm 0,55 ^a	243,90 \pm 20,77 ^a	127,20 \pm 10,40 ^a	34,74 \pm 1,20 ^a	27,80 \pm 1,72 ^a
EXT-PÓS	25,70 \pm 2,35 ^a	7,67 \pm 1,15 ^a	217,40 \pm 15,83 ^{ab}	121,64 \pm 16,94 ^a	35,66 \pm 5,76 ^a	29,35 \pm 3,33 ^a
Aos 63 dias						
PEL	28,60 \pm 2,75 ^a	7,62 \pm 0,64 ^a	157,00 \pm 18,63 ^a	187,63 \pm 16,24 ^a	50,22 \pm 4,54 ^a	26,85 \pm 0,96 ^a
PEL-PRÉ	29,20 \pm 0,90 ^a	7,74 \pm 0,24 ^a	193,40 \pm 17,86 ^a	155,42 \pm 13,38 ^a	41,29 \pm 3,72 ^a	26,54 \pm 0,67 ^a
PEL-PÓS	31,00 \pm 2,45 ^a	7,32 \pm 0,38 ^a	195,90 \pm 20,97 ^a	167,00 \pm 24,92 ^a	39,19 \pm 4,96 ^a	23,86 \pm 1,06 ^a
EXT	26,20 \pm 1,36 ^a	7,58 \pm 0,61 ^a	155,70 \pm 14,47 ^a	172,02 \pm 11,75 ^a	49,01 \pm 1,72 ^a	28,77 \pm 1,13 ^a
EXT-PÓS	33,70 \pm 2,54 ^a	7,93 \pm 0,75 ^a	215,80 \pm 19,60 ^a	168,93 \pm 14,30 ^a	37,65 \pm 3,97 ^a	22,82 \pm 2,81 ^a

PEL = peletizada sem probiótico; PEL-PRÉ = peletizada com inclusão do probiótico antes do processamento; PEL-PÓS = peletizada com inclusão do probiótico após o processamento; EXT = extrusada sem probiótico; EXT-PÓS = extrusada com inclusão do probiótico após o processamento; Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g 100 mL⁻¹); Er = número de eritrócitos (10⁴ mm⁻³); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (%) CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); Letras diferentes na coluna diferem significativamente segundo teste de Tukey (P<0,05).

Os valores de Hb não foram significativos durante o experimento, entretanto, sua variação foi similar aos reportados para a mesma espécie por ALKAHEM (1994); UEDA *et al.* (1997); TAVARES-DIAS e FAUSTINO (1998) e TAVARES-DIAS *et al.* (2000).

No 42º dia, apenas os valores de Er foram estatisticamente superiores nos peixes que receberam ração peletizada sem probiótico; peletizada com inclusão do probiótico antes do processamento, extrusada sem probiótico e extrusada com inclusão do probiótico após o processamento quando comparados aos que receberam ração peletizada com inclusão do probiótico após o processamento (Tabela 2), corroborando comparativamente aos encontrados

por TAVARES-DIAS e FAUSTINO (1998); ADEPARUSI e ATAYI (2000) e HISANO *et al.* (2003).

Aos 42º e 63º dias, os valores médios de VCM, HCM e CHCM foram semelhantes (Tabela 2) aos verificados por UEDA *et al.* (1997); TAVARES-DIAS e FAUSTINO (1998); ADEPARUSI e ATAYI (2000); TAVARES-DIAS *et al.* (2000; 2002).

O tamanho reduzido dos eritrócitos mostra um caminho mais curto para difusão de oxigênio, além de uma maior concentração de Hb. Estas alterações possibilitaram o consumo de oxigênio nas brânquias e a liberação de oxigênio em diferentes tecidos, segundo MOYLE e CECH Jr. (1982).

Neste estudo, os parâmetros hematológicos da série vermelha dizem respeito ao estado geral da saúde dos peixes e por não apresentarem alterações significativas, indicaram que os mesmos encontraram-se saudáveis, corroborando aos estudos realizados por ISHIKAWA *et al.*, (2007); BARROS *et al.* (2009) e HARIKRISHNAN *et al.* (2010). É sabido que as células sanguíneas apresentam grande variação nos valores de contagem dependendo de fatores como, qualidade da água, estado nutricional, sistema de criação (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Portanto, a comparação dos valores, em geral, é realizada em relação ao controle do próprio experimento.

Provavelmente, o estresse de manejo no início do experimento ocasionou aumento significativo, até o 21º dia, do Ht, coincidindo com a elevação de Hb, Er e VCM, porém, com diminuição do CHCM nos peixes que receberam ração peletizada com inclusão do probiótico após o processamento e extrusada com inclusão do probiótico após o processamento. Isto significa que os peixes produziram células maiores (imaturas provavelmente) e com menor concentração dos valores de Hb no interior das células como resultado da adição do probiótico na ração.

Neste estudo os valores do número de trombócitos foram inferiores (Tabela 3) aos constatados por UEDA *et al.* (1997), que observaram a variação de 38.540,00-100.800,00 μL^{-1} . Segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), além da variação interespecífica, as diferenças metodológicas empregadas na contagem de trombócitos são responsáveis por essas diferenças marcantes.

Embora trombócitos e leucócitos sejam células de linhagens diferentes, sob o ponto de vista da Patologia, podem ser agrupados nas contagens relativas e denominados células sanguíneas de defesa orgânica (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000). Diversos autores atribuíram funções destas células nos peixes, entre elas, a importância no processo de coagulação (CASILLAS e SMITH, 1977) e fagocitose (HILL e ROWLEY, 1996).

Tabela 3. Médias \pm erro padrão da contagem de trombócitos em juvenis de tilápia-do-nilo nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Tb
	Aos 21 dias
PEL	18.005,50 \pm 3.010,71
PEL-PRÉ	19.529,50 \pm 2.831,57
PEL-PÓS	20.566,50 \pm 1.526,26
EXT	19.654,38 \pm 3.316,14
EXT-PÓS	20.690,00 \pm 2.626,85
Aos 42 dias	
PEL	21.028,00 \pm 3.406,38
PEL-PRÉ	19.775,00 \pm 1.767,28
PEL-PÓS	18.722,50 \pm 1.850,89
EXT	20.670,00 \pm 3.375,97
EXT-PÓS	19.803,00 \pm 1.997,00
Aos 63 dias	
PEL	17.497,50 \pm 3.546,89
PEL-PRÉ	19.308,50 \pm 1.920,40
PEL-PÓS	16.064,50 \pm 1.853,72
EXT	17.963,00 \pm 2.213,76
EXT-PÓS	16.692,00 \pm 1.350,71

PEL = peletizada sem probiótico; PEL-PRÉ = peletizada com inclusão do probiótico antes do processamento; PEL-PÓS = peletizada com inclusão do probiótico após o processamento; EXT = extrusada sem probiótico; EXT-PÓS = extrusada com inclusão do probiótico após o processamento. Tb = trombócitos (μL^{-1}). Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$).

A variação do número de linfócitos não foi significativa entre tratamentos e tempos (Tabela 4). Em trabalhos com tilápia-do-nilo realizados por UEDA *et al.* (1997); TAVARES-DIAS e FAUSTINO (1998) e TAVARES-DIAS e MORAES (2003) foram encontrados valores superiores.

Em relação à função destas células nos peixes, ELLIS (1977) atribuiu a característica de imunocompetentes. Já os neutrófilos mobilizam-se rapidamente para o local da injúria, minimizando a expansão da doença e iniciando a resposta imune. DOGGETT e HARRIS (1989) consideram os neutrófilos como as maiores células fagocíticas, visto que são capazes de ingerir tanto partículas de carbono como bactérias.

Tabela 4. Médias \pm erro padrão das contagens total e diferencial de leucócitos (número μL^{-1}) em juvenis de tilápia-do-nylo nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Lc	Lf	Mn	Nt	Bs
	Aos 21 dias				
PEL	21.715,50 \pm 2.012,25	16.513,19 \pm 1.566,46	2.483,26 \pm 1.74,00	2.719,05 \pm 544,32	0,00 \pm 0,00
PEL-PRÉ	23.303,50 \pm 1.939,87	17.085,42 \pm 1.455,29	3.574,22 \pm 771,82	2.582,62 \pm 242,53	61,25 \pm 23,34
PEL-PÓS	23.685,50 \pm 2.094,47	18.356,13 \pm 1.471,83	2.949,64 \pm 522,17	2.333,42 \pm 336,44	46,31 \pm 28,50
EXT	21.765,63 \pm 1.959,05	16.948,06 \pm 1.959,76	2.362,67 \pm 174,89	2.454,90 \pm 427,81	0,00 \pm 0,00
EXT-PÓS	24.205,50 \pm 2.354,03	18.416,88 \pm 1.647,56	3.367,07 \pm 437,48	2.338,61 \pm 358,34	82,95 \pm 54,89
Aos 42 dias					
PEL	21.414,00 \pm 3.276,78	15.851,31 \pm 2.520,73	2.424,41 \pm 457,44	3.113,50 \pm 416,70	24,77 \pm 24,77
PEL-PRÉ	22.245,50 \pm 4.110,22	16.379,26 \pm 2.770,30	3.159,86 \pm 355,23	2.646,48 \pm 529,82	59,90 \pm 35,94
PEL-PÓS	23.610,00 \pm 2.666,75	18.031,07 \pm 1.811,91	2.973,28 \pm 552,21	2.576,51 \pm 365,43	29,15 \pm 29,15
EXT	19.992,50 \pm 1.562,39	14.507,79 \pm 1.198,20	2.497,50 \pm 243,59	2.987,21 \pm 459,70	0,00 \pm 0,00
EXT-PÓS	22.239,00 \pm 1.572,65	16.954,65 \pm 1.047,55	2.431,02 \pm 385,31	2.813,11 \pm 562,47	40,22 \pm 36,72
Aos 63 dias					
PEL	19.613,00 \pm 2.604,49	15.463,79 \pm 1.961,61	2.026,46 \pm 382,44	2.103,28 \pm 240,97	19,47 \pm 19,47
PEL-PRÉ	22.157,50 \pm 2.876,39	17.716,55 \pm 2.214,43	2.345,28 \pm 455,71	2.039,41 \pm 154,89	56,27 \pm 51,36
PEL-PÓS	21.135,00 \pm 3.169,31	17.084,54 \pm 2.555,14	2.328,09 \pm 469,45	1.691,48 \pm 125,78	30,90 \pm 18,94
EXT	19.356,00 \pm 2.233,46	15.187,43 \pm 1.397,60	2.168,72 \pm 603,33	1.999,85 \pm 232,53	0,00 \pm 0,00
EXT-PÓS	22.072,00 \pm 4.438,08	17.347,42 \pm 3.325,90	2.433,89 \pm 456,84	2.234,81 \pm 604,32	55,89 \pm 51,02

PEL = peletizada sem probiótico; PEL-PRÉ = peletizada com inclusão do probiótico antes do processamento; PEL-PÓS = peletizada com inclusão do probiótico após o processamento; EXT = extrusada sem probiótico; EXT-PÓS = extrusada com inclusão do probiótico após o processamento. Lc = leucócitos totais (μL^{-1}); Lf = linfócitos (μL^{-1}); Mn = monócitos (μL^{-1}); Nt = neutrófilos (μL^{-1}); Bs = basófilos (μL^{-1}); Es = eosinófilos (μL^{-1}). Não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$).

Foi constatada a presença discreta de basófilos na contagem diferencial no sangue dos peixes deste experimento (Tabela 4). A baixa frequência também foi relatada em diferentes espécies de peixes por RANZANI-PAIVA e GODINHO (1983) e VEIGA *et al.* (2000). Basófilos e eosinófilos são geralmente escassos no sangue de peixes, mas estudos de PITOMBEIRA e MARTINS (1970) e EZZAT *et al.* (1974) indicam que há diferenciação de células entre as espécies de peixes. A função dos basófilos nos peixes ainda não está bem definida e parece estar associada aos processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (ROBERTS, 1981).

BITTENCOURT *et al.* (2003) não encontraram basófilos ou eosinófilos, nem seus precursores, no sangue periférico de *O. niloticus*, criados em sistema semi-intensivo, e TAVARES-DIAS (2003) também não registrou eosinófilos, assim como em nosso estudo.

Os valores de contagem de células brancas (total e diferencial) deste experimento encontram-se de acordo com os valores encontrados por TAVARES-DIAS e MORAES (2004). No entanto, os valores determinados por JATOBÁ *et al.* (2011) demonstram que as tilápias alimentadas com *Lactobacillus plantarum* na dieta apresentaram valores mais elevados de contagem de trombócitos, linfócitos e neutrófilos do que os peixes alimentados com a bactéria probiótica. A resposta imunológica devido ao aumento nos valores das células brancas do sangue provavelmente esteja associada à introdução de grandes quantidades de bactérias na alimentação dos peixes segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004). Existem indícios que os trombócitos atuam como células fagocíticas de defesa e, portanto, um aumento nos valores de número de trombócitos seria esperado neste trabalho, o que não ocorreu. O processamento da ração, neste experimento,

pode influenciar na eficiência de incorporação e ação do probiótico no peixe, e pouco pela disponibilidade dos nutrientes na ração nos parâmetros sanguíneos. A contagem de células brancas nas diferentes formas de processamento demonstrou que a presença do probiótico não alterou as células sanguíneas.

O fornecimento de probiótico na dieta dos peixes pode provocar imunoestimulação (JATOBÁ *et al.*, 2008 e JATOBÁ *et al.*, 2011) ocasionando um alerta/preparo para possíveis infecções; portanto, seria recomendado fornecer o probiótico antes de situações de alto estresse ou períodos de incidência de doenças. Neste estudo não foi observada alteração nos parâmetros sanguíneos de células brancas com o fornecimento do probiótico *B. subtilis* e *B. cereus* na dieta. Possivelmente, as alterações possam ocorrer em períodos bastante curtos após o início da alimentação (MERRIFIELD *et al.* 2010), não possibilitando a detecção das mudanças pelos métodos empregados.

Esperava-se, nesta pesquisa, aumento nos valores de contagem das células brancas sanguíneas, pois a imunoestimulação pode causar o aumento do número de leucócitos, linfócitos e trombócitos (Da SILVA *et al.*, 2012).

Os valores médios da CF apresentaram diferenças significativas entre os peixes alimentados com as dietas extrusadas sem probiótico e com sua inclusão após o processamento, indicando que o probiótico apresentou um efeito imunocompetente (Figura 1). Entretanto, os peixes alimentados com as dietas peletizadas, sem inclusão de probiótico ou com a inclusão do mesmo, antes e após do processamento, não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Foi possível visualizar as células fagocíticas ativas no lavado visceral (com leveduras em seu interior) e o número de leveduras no interior de cada célula (Figura 1).

O IF fornece informações a respeito da quantidade de microrganismos estranhos ao organismo que cada macrófago ativo foi capaz de fagocitar por meio da contagem do número de leveduras dentro de uma dada célula, porém, no presente estudo, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 1). O mesmo foi observado por DIAS (2010) em estudo com matrinxãs, *Brycon amazonicus*. PIRARAT *et al.* (2006) observaram que tilápias-do-nilo, alimentadas durante duas semanas com *Lactobacillus rhamnosus* na dieta, mostraram sinais de aumento de atividade fagocitária.

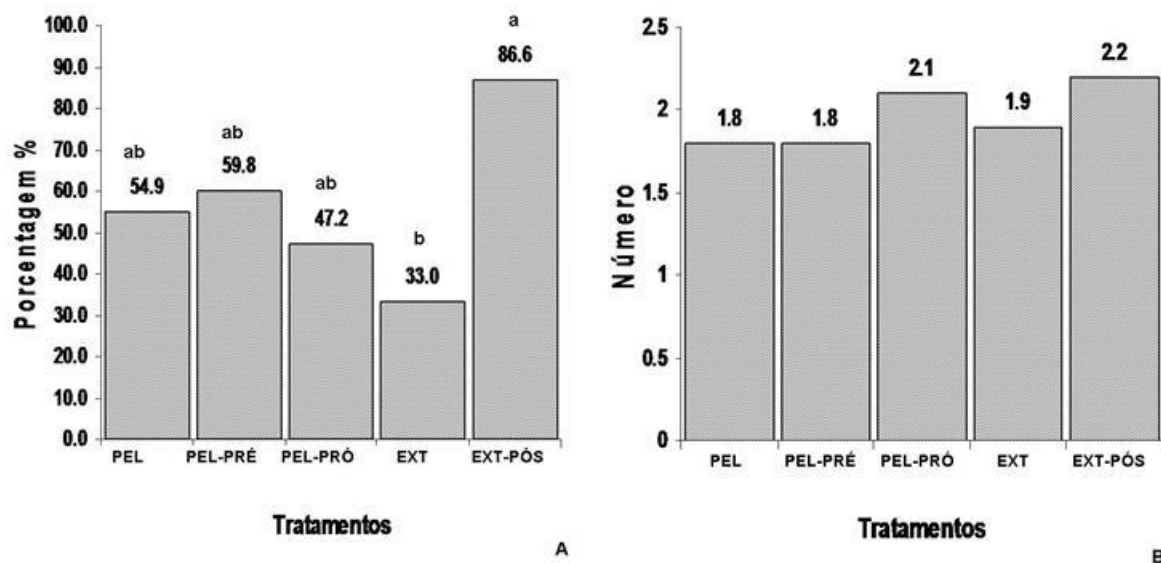


Figura 1. Capacidade Fagocítica (A) e Índice Fagocítico (B) de macrófagos de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas peletizada e extrusada sem e com suplementação de probiótico, ao final de 63 dias. (PEL = peletizada sem probiótico; PEL-PRÉ = peletizada com inclusão do probiótico antes do processamento; PEL-PÓS = peletizada com inclusão do probiótico após o processamento; EXT = extrusada sem probiótico; EXT-PÓS = extrusada com inclusão do probiótico após o processamento).

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

Este experimento foi realizado com bactérias Gram positivas, comprovando que as bactérias adicionadas à ração colonizaram o trato intestinal dos peixes (Tabela 5). Dados semelhantes foram verificados em pós-larvas de tilápias por TACHIBANA *et al.* (2011) em experimento com *Bacillus subtilis*, recuperando a quantidade de $1,15 \times 10^4$ e $4,74 \times 10^5$ UFC g^{-1} , em tratamentos com ração farelada contendo 5 e 10 g de probiótico kg^{-1} , respectivamente. Já MEURER *et al.* (2008) observaram a colonização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no intestino quando alimentaram pós-larvas e alevinos de tilápia-do-nylo com ração farelada.

Tabela 5. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC g^{-1}) *Bacillus* spp. realizada na ração antes do início do experimento e a recuperação de bactérias probióticas do trato intestinal de tilápias-do-nylo no 63º dia de experimento.

Tratamentos	Dieta experimental	Trato intestinal
PEL	$1,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$
PEL-PRÉ	$3,8 \times 10^7$	$4,9 \times 10^5$
PEL-PÓS	$2,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$
EXT	$1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$
EXT-PÓS	$3,8 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$

PEL = peletizada sem probiótico; PEL-PRÉ = peletizada com inclusão do probiótico antes do processamento; PEL-PÓS = peletizada com inclusão do probiótico após o processamento; EXT = extrusada sem probiótico; EXT-PÓS = extrusada com inclusão do probiótico após o processamento.

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

imunocompetentes para combater as enfermidades.

A recuperação das bactérias probióticas certifica que estas foram consumidas e continuam viáveis no intestino dos peixes para agirem como probiótico (TACHIBANA *et al.*, 2011), independentemente do tipo de processamento da ração. Entretanto, a adesão e a colonização do trato gastrointestinal não podem ser confirmadas com esta análise, somente com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura (RINGO *et al.*, 2003).

MERRIFIELD *et al.* (2010) demonstram grande preocupação com a forma de incorporação do probiótico na ração, citando que, na indústria do salmão, a grande quantidade de ração utilizada pode dificultar a inclusão. Os *Bacillus* spp possuem algumas vantagens sobre outras espécies de bactérias, pois produzem esporos, o que facilita a eficiência na incorporação da dieta.

Segundo PASTORE *et al.* (2012), cuidados devem ser tomados para minimizar a presença de possíveis contaminantes como, por exemplo, a limpeza dos materiais. Isto explicaria, neste estudo, a presença de *Bacillus* spp. verificada no intestino de tilápias-do-nylo que não receberam o probiótico na dieta. Embora a análise microbiológica possibilite a identificação do gênero, mas não da espécie, sua presença no intestino dos peixes dos tratamentos PEL e EXT pode ocorrer naturalmente (Tabela 5).

Neste trabalho, verificou-se que os métodos de inclusão do probiótico na ração foram eficazes, pois, nas análises microbiológicas das tilápias-do-nylo, constataram-se valores próximos de UFC de *Bacillus* spp. (Tabela 5) nos três tratamentos com inclusão de probióticos sendo que, em seguida, essas bactérias foram recuperadas do trato intestinal, indicando que as bactérias incluídas são viáveis para atuar como probiótico. Corroborando com MERRIFIELD *et al.* (2010), que asseguram que as bactérias probióticas devem manter-se viáveis quando incluídas nas dietas para atuar benéficamente no hospedeiro.

Demonstra-se, portanto, que qualquer forma de inclusão nas rações testadas (antes ou depois da peletização e após a extrusão), pode ser utilizada facilmente pelo piscicultor.

CONCLUSÕES

O probiótico composto por *Bacillus* spp. pode ser incluído na ração antes ou depois da peletização e após a extrusão, possibilitando recuperar as bactérias probióticas do intestino. A utilização do probiótico foi eficaz para promover o aumento da imunidade em juvenis de tilápiado-nilo alimentados somente com a dieta extrusada. Pode-se afirmar que os peixes mantiveram-se saudáveis, uma vez que os parâmetros hematológicos praticamente não sofreram alterações durante o período experimental.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa IMEVE Biotecnologia - Indústria de Medicamentos Veterinários Ltda; à Empresa Fri-ribe S/A; à Universidade Federal de São Carlos - UFSCar e ao Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP. Ao pesquisador científico Dr. Carlos Massatoshi Ishikawa pela colaboração nas análises microbiológicas.

REFERÊNCIAS

- ADEPARUSI, E.O. e ATAYI, A.D. 2000 Hematological characteristics of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed differently processed Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) diets. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., Rio de Janeiro, 3-7/set./2000. *Anais...* Rio de Janeiro: ISTA. p.131-137.
- AL-DOHAIL, M.A.; HASHIM, R.; ALUYU-PAIKO, M. 2011 Evaluation the use *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish, *Clarias gariepinus*, juveniles. *Aquaculture Research*, 42: 196-209.
- ALKAHEM, H.F. 1994 The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on hematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal University Kuwait Science*, 21: 243-252.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS 1990 *Official methods of analysis*. 15th ed. Arlington: AOAC. 1298p.
- BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. 2006 The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
- BARROS, M.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G. 2009 Hematological response and growth performance of Nile Tilapia fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, 40: 895-903.
- BITTENCOURT, N.L.R.; MOLINARI, L.M.; SCOARIS, D.O.; PEDROSO, R.B.; NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U.; ABREU FILHO, B.A.; DIAS FILHO, B.P. 2003 Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum*, 25: 385-389.
- BUCIO, A.; HARTEMINK, R.; SCHRAMA, J.W.; VERRETH, J.; ROMBOUTS, F.M. 2005 Survival of *Lactobacillus plantarum* 44a after spraying and drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(4): 221-227.
- BURR, G.; GATLIN, D.; RICKE, S. 2005 Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of World Aquaculture Society*, 36: 425-436.
- CASILLAS, E. and SMITH, L.S. 1977 Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, 10: 481-491.
- CHANG, C.-I., and LIU, W.-Y. 2002 An Evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for Reducing Edwardsiellosis in Cultured European Eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*, 25(5): 311-315.
- CHEN, C.Y.; WOOSTER, G.A.; BOWSER, P.R. 2004 Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulphate. *Aquaculture*, 239: 421-443.
- CROSS, M.L. 2002 Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34: 245-253.

- DA SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. 2012 Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 43(6): 908-916.
- DIAS, D.C. 2010 *Probióticos no desempenho produtivo, hematologia e migração de macrófagos do matrinxã, Brycon amazonicus*. Jaboticabal. 112p. (Tese de Doutorado em Aquicultura. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho). Disponível em: <http://www.caunesp.unesp.br/Publicacoes/Dissertacoes_Teses/Dissertacoes.pdf> Acesso em: 20 abr. 2010.
- DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M. 2008 Uso de probiótico em ração de rã-touro, *Rana catesbeiana*: desempenho produtivo. *Archivos de Zootecnia*, 57: 449-455.
- DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L., CORREA, C.F.; BORDON, I.C.A.C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2012 Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1): 40-45. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0426.2011.01892.x/full>>. Acesso em 15 fev. 2013.
- DOGGETT, T.A. e HARRIS, J.E. 1989 Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 33: 747-756.
- ELLIS, A.E. 1977 The leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*, 11: 453-491.
- EZZAT, A.A.; SHABANA, M.B.; FARGHALY, A.M. 1974 Studies on the blood characteristics of *Tilapia zillii* (Gervais). I. Blood cells. *Journal of Fish Biology*, 6: 1-12.
- FAO/WHO 2001 Report on Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 1-4/out./2001, Córdoba, Argentina. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf> Acesso em: 23 ago. 2009.
- FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; CYRINO, J.E.P. 2012 Exigências nutricionais e alimentação em tilápia. In: FRACALLOSSI, D.M. e CYRINO, J.E.P. *Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira-NUTRIAQUA*. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia aquática, 2012. Gráfica e Editora Copiart Ltda. p. 255-268.
- GATESOUBE, F.J. 2008 Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, 14: 107-114.
- GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; JERÔNIMO, G.T. 2006 Ectoparasites influence on the haematological parameters of Nile tilapia and carp cultured in the State of Santa Catarina, South Brazil. *Journal of Fish and Aquatic Science*, 1: 270-276.
- GILL, H.S.; RUTHERFURD, K J.; PRASAD, J.; GOPAL, P.K. 2000 Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*, 83: 167-176.
- GULLIAN, M.; THOMPSON F.; RODRIGUEZ J. 2004 Selection of probiotic bacteria and study of their immunoestimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233: 1-14.
- HARIKRISHNAN. R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M.S. 2010 Supplementation diet containing probiotics, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. *Fisheries and Aquaculture Journal*, Volume 2010: FAJ-4: 1-11.
- HILL, D.J. e ROWLEY, A.F. 1996 The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. *Britany Journal of Haematology*, 92: 200-211.
- HISANO, H.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; KLEEMANN, G.K.; FREIRE, E.S.; GONÇALVES, G.S.; ZUANON, J.A.S.; SÁ, M.V.C. 2003 Yeast and zinc on hematological parameters of Nile tilapia fingerlings, *Oreochromis niloticus*. In: WORLD AQUACULTURE 2003, Salvador, BA, 19-23/mai./2003. *Anais...* Salvador: WAS. p.575.

- HRUBEC, T.C. e SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Ed.). *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Sydney: W. W. Lippincott. p.1120-1125.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. 2000 Hematology and chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, 29: 7-12.
- IMAGAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N.; SUGIMURA, M. 1989 Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Japan Journal of Veterinary Science*, 51: 1163-1172.
- IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002 Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25: 333-342.
- ISHIKAWA, C.M. 1998 *Quantificação bacteriana e avaliação das lesões em peixes da espécie Oreochromis niloticus (tilápia do Nilo) inoculadas experimentalmente com Mycobacterium marinum ATCC 927*. São Paulo. 58p. (Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - USP). Disponível em. <<http://www.fmvz.usp.br>> Acesso em: 18 jun. 2010.
- ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; FERREIRA, C.M. 2007 Hematological parameters in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 619-626
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. 2008 Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 1201-1207.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; SILVA, B.C.; SEIFFERT, W.Q.; ANDREATTA, E.R. 2011 Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 725-732.
- KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. 2008 Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.
- KUBITZA, F. 1999 *Nutrição e alimentação dos peixes cultivados*. 3ªed. Jundiaí: Kubitza, F. 123p.
- LARA-FLORES, M.L.; BRIONES, L.E.; NOVOA, M.A.O. 2002 Avances en utilización de probiotico como promotores de crecimiento em tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: CRUZ-SUÁREZ, L.E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GAXIOLA-CORTÉS, M.G.; SIMOES, N. (Eds) *Avances en nutrición acuícola*. Memórias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 6, 2002, Cancún. *Anais...* Cancún: CICESE, 2002. p.314-335.
- 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. e 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.
- MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. 2010 The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; MAUERWERK, V.L.; MASCIOLI, A.S.; COLPINI, L.M.S.; FRECCIA, A. 2008 Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9: 804-812.
- MOURIÑO, J.L.P.; NASCIMENTO VIEIRA, F.; JATOBÁ, A.B.; DA SILVA, B.C.; JESUS, G.F.A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. 2012 Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parametres of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquaculture Nutrition*, 18: 73-80.
- MOYLE, P.B. e CECH JR, J.J. 1982 *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 309p.

- NAGESWARA, P.V. e BABU, D.E. 2006 Probiotics as an alternative therapy to minimize or avoid antibiotics use in aquaculture. *Fishing Chimes*, 26(1): 112-114.
- NAYAK, S.K. 2010 Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 2-14.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1993 *Nutrient Requirements of Warm water, Fishes and Shellfishes: Nutrient Requirements of Domestic Animals*. Washington. 125p.
- PASTORE, S.C.G.; GAIOTTO, J.R.; RIBEIRO, F.A.S.; NUNES, A.J.P. 2012 Formulação de rações e boas práticas de fabricação. In: FRACALOSSI, D.M. e CYRINO, J.E.P. *Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aqüicultura brasileira*. NUTRIAQUA. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia aquática, 2012. Gráfica e Editora Copiart Ltda. p.293-346.
- PIRARAT, N.; KOBAYASHI, T.; KATAGIRI, T.; MAITA, M.; ENDO, M. 2006 Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113: 339-347.
- PITOMBEIRA, M.S. e MARTINS, J.M. 1970 Haematology of the Spanish mackerel, *Scomberomorus maculatus*. *Copeia*, 1: 182-186.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1983 Sobre células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 43: 331-338.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A. 2004 Hematologia de peixes Brasileiros In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Varela, São Paulo, p.89-120.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; LUQUE, J.L. 2005 Parasitological and hematological analysis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. *Acta Scientiarum*, 27: 231-237.
- RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPON, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. 2000 Immunity enhancement in black tiger shirimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture*, 191: 271-288.
- RINGO, E. e GATESOUBE, F., 1998 Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- RINGO, E.; OLSEN, R.E.; MAYHEWC, T.M.; MYKLEBUSTD, R. 2003 Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227: 1-4.
- ROBERTS, R.J. 1981 *Patologia de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa. 366p.
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantã*, 20: 329-334.
- SAHU, M.K.; SWARNAKUMAR, N.S.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. 2008 Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48: 299-308.
- SELVIN, J.; HUXLEY, A.J.; LIPTON, P. 2004 Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture*, 230: 242-248.
- SETLOW, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 514-525.
- 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 Fish Biology*, 60: 466-478.
- SILVA, J.R.M.C.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES, J.C.S.; JENSCH-JUNIOR, B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, 28(4): 326-328.
- TACHIBANA, L.; DIAS, D.C.; ISHIKAWA, C.M.; CORREA, C.F.; LEONARDO, A.F.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2011 Probiótico na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* Lineu, 1758): desempenho zootécnico e

- recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos*, 25(1): 25-31.
- TAPIA-PANIAGUA, S.T.; CHABRILLÓN, M.; DÍAZ-ROSALES, P.; BANDA, I.G.; LOBO, C.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. 2010 Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2): 310-319.
- TAVARES-DIAS, M. 2003 *Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica*. Jaboticabal. 248p. (Tese de Doutorado em Aqüicultura. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho). Disponível em: <http://www.caunesp.unesp.br/Publicacoes/Dissertacoes_Teses/Dissertacoes.pdf> Acesso em: 13 abr. 2010.
- TAVARES-DIAS, M. e FAUSTINO, C.D. 1998 Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. *Ars Veterinária*, 14: 254-263.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2003 Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturadas em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 107-114.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2004 *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Ed. Eletrônica e Arte Final. Riberão Preto. SP. 144p.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C.; MORAES, F.R. 2000 Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolopis hornorum* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., Rio de Janeiro, 3-7/set./2000. *Anais...* Rio de Janeiro: ISTA. p.533-541.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. 2002 Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. *Boletim do Instituto de Pesca*, 28: 1-9.
- 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.
- WELKER, T.L. e LIM, C. 2011 Use of probiotics in diets of tilapia. *Journal of Aquaculture Research & Development* (on-line), S1:014: 1-8. DOI: 10.4172/2155-9546.S1-014
- VEIGA, M.L.; EGAMI, M.I.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L. 2000 ASPECTOS morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Revista Chilena de Anatomía*, 18: 245-250.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655-671.
- VIEIRA, J.S.; LOGATO, P.V.R.; RIBEIRO, P.A.P.; FREITAS, R.; FIALHO, E.T. 2005 Efeito do processamento do milho sobre o desempenho e composição de carcaça de piaba (*Leporinus friderici*) criada em tanques-rede. *Ciência e Agrotecnológica*, 29: 453-458.
- ZAR, J.H. 2009 *Biostatistical Analysis*. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA. 576p.