

Maria Luiza Ruiz

Diferentes concentrações de *Lactobacillus plantarum* em dietas para tilápia-do-nilo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. José Luiz Pedreira Mourião

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ruiz, Maria Luiza

Diferentes concentrações de *Lactobacillus plantarum* em dietas para tilápia-do-nylo / Maria Luiza Ruiz ; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño - Florianópolis, SC, 2016.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Sanidade aquícola. 3. Profilaxia. 4. Histologia. 5. Suplemento dietário. I. Mouriño, José Luiz Pedreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Diferentes concentrações de *Lactobacillus plantarum* em dietas para tilápia do Nilo

Por

MARIA LUIZA RUIZ

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dr. José Luiz Pedreira Mourão – *Orientador*

Dr. Eduardo Carginin Ferreira - UFSC

Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC

Dr. Maurício Laterça Martins - UFSC

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado a capacidade e a força necessária para atravessar este período de adaptações e mudanças.

Aos meus pais, Antonio Ruiz Marques e Cláudia de Matos Alves por acreditar sempre em mim e me dar o suporte necessário para todas as empreitadas da minha vida, a vocês a gratidão não cabe em palavras. Aos meus irmãos e a toda minha família também deixo meu muito obrigada.

Agradeço ao Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño por ter aceitado me orientar e ter dividido seu conhecimento com tamanha generosidade.

Agradeço a MSc Patricia Garcia pelos ensinamentos e por todo o suporte técnico dispensado para a realização do processamento e análises histológicas.

Aos Mestres Luiz Eduardo Tavares Gonçalves, Lucas Cardoso, Jhon Edison Jimenez e Scheila Anelise Pereira pela paciência e ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório Aquos, que se transformaram em uma verdadeira família, a vocês caros colegas, agradeço pelas conversas e risadas. Em especial ao aluno de graduação de engenharia de aquicultura José Victor Ferrarezi pelo auxílio e por ter passado pelo processo de aprendizagem junto comigo.

Enfim, agradeço a todos que me acompanharam e que estiveram do meu lado, seja na parte técnica ou humana o meu mais profundo e sincero muito obrigada.

RESUMO

As bactérias patogênicas são organismos importantes para a piscicultura por causa dos prejuízos que causam. Na tilapicultura, para reduzir a possibilidade dessas enfermidades, são utilizados micro-organismos probióticos, que se mantêm vivos no trato digestório dos animais e possuem a habilidade de melhorar a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação com diferentes concentrações do probiótico *Lactobacillus plantarum* e seus efeitos sobre os índices zootécnicos, hematológicos e histopatológicos da tilápia-do-nilo. Foram utilizados 240 juvenis com $5,83 \pm 0,83$ cm de comprimento total médio e $3,72 \pm 1,48$ g de peso médio. Os animais foram distribuídos em 16 tanques com aeração constante, sistema de recirculação contínuo e quatro tratamentos em quadruplicata: controle (sem suplementação), 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ de dieta contendo *L. plantarum*. Após 35 dias, constatou-se que a suplementação probiótica não influenciou os parâmetros zootécnicos e hematológicos. Nos rins, entretanto, houve redução da presença de células granulocíticas especiais LG – PAS entre as coletas (15 e 35 dias). O fígado apresentou menores danos com relação ao aspecto cordonal nos animais suplementados com 10^8 UFC·g⁻¹ aos 15 dias; já para os grupos suplementados com 10^4 e 10^8 UFC·g⁻¹ apresentaram menor grau de congestão hepática aos 35 dias. O probiótico atuou também na redução do número de centros de melanomacrófagos no tecido esplênico, além de aumentar a quantidade de células caliciformes encontradas nas vilosidades intestinais.

Palavras chave: aquicultura; sanidade aquícola; profilaxia; histologia; suplemento dietário.

ABSTRACT

Pathogenic bacteria are important organisms for fish farming because of the damage they cause. To reduce the possibility of such problems, probiotics are used in the cultivation of Nile tilapia, because they are beneficial microorganisms that enter the digestive tract of animals, remain alive and have the ability to improve feed efficiency, the immune system and/or balance the ratio of beneficial and pathogenic bacteria. The aim of this study was to evaluate the supplementation with different concentrations of probiotic *Lactobacillus plantarum* and its effects on zootechnical, hematological and histological indexes for Nile tilapia. 240 juveniles were used with total length 5.83 ± 0.83 cm and average weight 3.72 ± 1.48 g. The animals were distributed in 16 tanks with constant aeration, continuous recirculation system and four treatments in quadruplicate: control (non supplemented), 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU·g⁻¹ of the diet containing *L. plantarum*. After 35 days, it was found that probiotic supplementation does not affect the zootechnical and hematological parameters. In the kidneys, however, there were a reduction of the presence of special granulocytic cells LG - PAS (15 and 35 days). The liver showed minor damage in relation to cordon aspect in fish fed 10^8 CFU·g⁻¹; fish fed 10^4 and 10^8 CFU·g⁻¹ showed lower degree of congestion at day 35. The probiotic also reduced the number of melanomacrophage centers in splenic tissue, and increased the amount of goblet cells found in the intestinal villi.

Keywords: aquaculture; aquaculture health; prophylaxis; histology; dietary supplements.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1 - Espécime de tilápia-do-nilo (Linnaeus, 1758)..... 18
- Figura 2 - Sinais clínicos observados em tilápia-do-nilo acometidas por diferentes gêneros bacterianos 21

CAPÍTULO 1

- Figura 1. A. Tecido renal com infiltrado de LG-PAS; B. Tecido hepático com congestão; C. Tecido esplênico apresentando centros de melanomacrófagos; D. Detalhe de centro de melanomacrófago em tecido esplênico; E. Vilosidades intestinais; F. Células caliciformes.... 29

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1- Espécies de bactérias utilizadas como probióticos, concentrações, tempo de fornecimento e principais efeitos mensurados em tilápia-do-nilo	24
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Ganho de peso, eficiência alimentar e conversão alimentar de tilápia-do-nilo suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g ⁻¹ por 15 e 35 dias ¹	36
---	----

Tabela 2. Valores hematológicos em tilápia-do-nilo suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g ⁻¹ por 15 e 35 dias ¹	37
---	----

Tabela 3. Valores hematológicos da série branca, contagem total e diferencial, de tilápias do Nilo suplementadas com <i>Lactobacillus plantarum</i> nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g ⁻¹ por 15 e 35 dias ¹	38
--	----

Tabela 4. Comprimento, largura e perímetro em μm da secção intermediária do intestino de tilápia-do-nilo após a suplementação com <i>Lactobacillus plantarum</i> nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g ⁻¹ e no grupo controle para 15 e 35 dias ¹	41
---	----

Tabela 5. Número de células caliciformes (CC), número de vilos e diâmetro intestinal (μm) da secção intermediária do intestino de tilápia-do-nilo após a suplementação com <i>Lactobacillus plantarum</i> nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g ⁻¹ para 15 e 35 dias ¹	42
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 A tilápia-do-nilo <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)	17
1.2 Bacterioses na tilapicultura	20
1.3 Probióticos	22
2. JUSTIFICATIVA	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
CAPÍTULO 1	29
Influência da suplementação dietética de <i>Lactobacillus plantarum</i> em diferentes órgãos da tilápia-do-nilo	29
Resumo	30
Abstract	31
Introdução	31
Material e métodos	32
<i>Material biológico</i>	32
<i>Preparo da dieta experimental suplementada com probiótico</i>	32
<i>Condições experimentais</i>	33
<i>Parâmetros físico-químicos da água</i>	33
<i>Índices zootécnicos</i>	33
<i>Análise hematológica</i>	34
<i>Análise histológica</i>	34
<i>Análises estatísticas</i>	35
Resultados	35
<i>Índices zootécnicos</i>	35
<i>Índices hematológicos</i>	37
<i>Análise histológica</i>	39
Discussão	43
Conclusão	45
Agradecimentos	45
Referências	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	51

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é conhecida como um dos setores agropecuários que mais cresce em todo o mundo: entre 1980 e 2012, houve incremento do volume da produção à taxa média anual de 8,6% (FAO, 2014). Os peixes estão entre as comódites alimentares mais negociadas e constituem a principal fonte proteica em 21 países (TROELL et al., 2014). Esse recurso alimentar é encarregado pelo fornecimento de micronutrientes e ácidos graxos essenciais para a população em nações em desenvolvimento (KAWARAZUKA; BÉNÉ, 2011).

A aquicultura de águas interiores é uma área bastante diversificada que apresenta grande variedade de espécies e práticas de cultivo. Em 2012 este setor apresentou um volume produtivo de 66,6 milhões de toneladas, sendo que na produção de peixes criados em viveiros, registrou-se aumento de 13% entre 1980 e 2012 (FAO, 2014). Os países que mais contribuem para a aquicultura de águas interiores são os asiáticos, onde a China foi responsável por mais da metade (60,1%) da produção mundial; o Brasil, neste cenário, também se encontra entre os dez maiores fornecedores, sendo responsável por 0,9% desta produção (FAO, 2015).

Os principais grupos de peixes cultivados pela piscicultura de água doce em 2010 foram carpas, tilápias e outros ciclídeos, bagres, pangásius e percas (FAO, 2012). A tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Figura 1) atualmente é a segunda espécie mais produzida mundialmente, e foi um dos primeiros peixes a serem cultivados (NEGRONI, 2013). O cultivo de tilápias em conjunto com o de outros ciclídeos é o mais disseminado no mundo, sendo encontrado em 135 países e territórios, em todos os continentes (FAO, 2014).

1.1 A tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

A produção de tilápia apresenta ampla distribuição geográfica, sendo 72% delas produzidas na Ásia, 19% na África e 9% na América (FAO, 2012). A América do Sul tem como maiores produtores o Brasil, a Colômbia e o Equador, perfazendo juntos 98,5% do total de tilápias produzidas em 2002 (EL – SAYED, 2006).

No Brasil, a tilapicultura foi introduzida em meados de 1950 e atualmente representa uma das indústrias com maior expansão, uma vez que o país apresenta condições ambientais adequadas juntamente com vasto recurso hídrico (FITZSIMMONS, 2000). A tilápia foi o pescado mais cultivado em 2014, representando 41,9% do total de peixes

produzidos, e gerou uma renda de cerca de 962 milhões de reais, com incremento de 17,3% em relação à produção obtida no ano anterior (IBGE, 2014).

O estado de Santa Catarina foi o quinto maior produtor de peixes em 2014, com 31.602.919 kg produzidos, responsável por 6,7% da produção nacional de pescados (IBGE, 2014). Seguindo a tendência apresentada em nível nacional, as tilápias também foram os peixes de água doce mais cultivados no estado com 67,37% da produção, seguidas pelas carpas com 25,06% (EPAGRI, 2015).

Esses peixes são nativos da África e do Oriente Médio, porém, a característica cosmopolita facilitou sua introdução em diversos países (CANONICO et al., 2005). Eles são facilmente identificados pela linha lateral ininterrupta, comprimidos lateralmente com longas nadadeiras dorsais, a porção anterior possui espinhos que também podem ser encontradas na pélvis e nadadeira anal (POPMA; MASSER, 1999).

Figura 1- Espécime de tilápia-do-nilo (Linnaeus, 1758)



A tilápia possui hábito alimentar onívoro de amplo espectro, podendo aproveitar uma vasta variedade de itens, incluindo plâncton, macrófitas aquáticas, invertebrados bentônicos, larvas de peixes e detritos (POPMA; MASSER, 1999). Até o terceiro dia de vida, as larvas desta espécie dependem do saco vitelínico para sua nutrição e, a partir deste período, em sistemas de cultivo, é comumente realizado o incremento com dietas artificiais em forma de pó ou farelo ($< 0,06$ mm), possibilitando a redução de riscos de canibalismo e o aumento das taxas de crescimento e eficiência alimentares (NG; ROMANO, 2013).

Apresentam rápida taxa de crescimento e ciclo produtivo com duração média de 180 dias, menor quando comparado com peixes redondos e carnívoros (280 e 340 dias, respectivamente), podendo ser realizados até dois ciclos por ano, além de demonstrar excelente conversão alimentar (1,25), ou seja, necessitam de um menor consumo

de ração para produção por kg de pescado (EMATER, 2012). Toleram grande amplitude nas variáveis físico-químicas da água, sendo a faixa de conforto térmico de 26 a 30°C, concentração de oxigênio dissolvido de 4 mg·L⁻¹ a 16 mg·L⁻¹ e pH de 6 a 9 (BOYD, 1997). Este pescado possui, ainda, boa aceitação pela população e valor comercial competitivo (MORAES et al., 2009), suporta diferentes condições nos diversos sistemas produtivos (DE SILVA, 2004) demonstrando, assim, sua grande aptidão para o cultivo e produção de carne.

Os sistemas de cultivo são diversificados e classificados em extensivo, semi-intensivo e intensivo, podendo ser realizados, por exemplo, em viveiros escavados, tanques-rede, tanques circulares e *raceways*. Os viveiros, principalmente os tanques escavados, são comumente utilizados para a criação desta espécie. Porém, quando se objetiva a engorda, alevinos sexualmente revertidos para machos são recomendados, pois atingem mais rapidamente do que as fêmeas o peso de comercialização (FARIA et al., 2013).

O cultivo realizado em tanques-rede é uma alternativa para explorar corpos d'água que apresentem obstáculos para a piscicultura convencional (CAMPOS et al., 2007). Geralmente é instalado em lagos e reservatórios, tende a ser pouco dispendioso, é de fácil construção e administração, as estruturas podem ser fixas ou flutuantes e possibilita a elevação da densidade de estocagem (BEVERIDGE; STEWART, 1998).

A utilização de tanques circulares permite maior controle sobre os parâmetros ambientais (temperatura da água, concentração de oxigênio dissolvido e pH), facilita o manejo alimentar e sanitário em casos de surtos de doenças, porém, para apresentar boas taxas de crescimento, os animais devem receber ração balanceada, uma vez que essas estruturas praticamente não oferecem fontes naturais de alimentos (DeLONG et al., 2009). As tilápias também podem ser cultivadas em *raceways*, canais de concreto que possibilitam altas taxas de renovação de água e de densidade de estocagem, incrementando a produtividade por m³ (SILVA et al., 2003).

Na região nordeste, as lagoas fertilizadas são amplamente utilizadas e, nas regiões sul e sudeste, em contrapartida, tanques redes, *raceways* e tanques redondos intensivos são as estruturas mais empregadas (FITZSIMMONS, 2000).

A maior tecnificação possibilitou a intensificação produtiva. No entanto, más condições sanitárias, alta densidade de estocagem, manipulação inapropriada e descarte incorreto dos animais mortos podem ser citados como fatores que favorecem o surgimento de doenças

na aquicultura (MILLANAO et al., 2011). Dentre todas as doenças, as de origem bacteriana apresentam maior impacto, uma vez que estes organismos podem ser a causa primária das doenças ou ainda atuar como agentes invasores secundários, aproveitando-se do sistema imune comprometido ou de injúrias tegumentares presentes nos hospedeiros (LEWBART, 2001).

1.2 Bacterioses na tilapicultura

Dentre as bacterioses que afetam as tilápias, destacam-se os gêneros *Streptococcus*, *Francisella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Edwardsiella* e *Enterococcus* (EL – SAYED, 2006, SILVA et al., 2009, DONG et al., 2015). Quando instaladas no ambiente são limitantes para o desenvolvimento do cultivo, uma vez que causam inúmeros sinais clínicos (Figura 2) que podem culminar em mortalidade.

O *Streptococcus* é uma bactéria Gram-positiva com capacidade de causar surtos de meningoencefalite (processo inflamatório do sistema nervoso central) e septicemia (infecção bacteriana generalizada geralmente transportada através da via hematopoiética) (TAVARES et al., 2016). A *Francisella* é considerada um patógeno emergente, uma vez que sua ocorrência foi relatada em alevinos de tilápia no Brasil apenas em 2012, podendo causar granulomas generalizados, ulcerações cutâneas e nos órgãos internos, afetando principalmente alevinos (LEAL et al., 2014).

As *Aeromonas* e *Pseudomonas* são bactérias Gram-negativas oportunistas responsáveis por provocar septicemia hemorrágica nos seus hospedeiros (AUSTIN; AUSTIN, 2012); a *Flavobacterium columnare* tem como característica o surgimento de pontos acinzentados no corpo do animal, erosão de pele e nadadeiras (DECOSTERE et al., 1999); o *Vibrio vulnificus* tem a habilidade de produzir extensas áreas hemorrágicas nos animais acometidos, além de ser potencialmente zoonótico (FOUZ et al., 2002).

Por sua vez, a *Edwardsiella tarda* faz parte da família das enterobactérias, manifesta-se na forma de abscessos cutâneos ou musculares repletos de gás (IREGUI et al., 2012); os *Enterococcus* promovem hemorragias musculares, exoftalmia e necrose do baço e rins (MARTINS et al., 2008). Todas as bactérias citadas, quando associadas a fatores predisponentes, causam grandes surtos de mortalidade sendo responsáveis por extensas perdas econômicas nos cultivos.

Figura 2. Sinais clínicos observados em tilápias do Nilo acometidas por diferentes gêneros bacterianos



A. eritrodermatite causada por *Aeromonas salmonicida*; B. granulomas em animais infectados por *Francisella*; C. exoftalmia decorrente de infecção por *Pseudomonas*; D, E, e F. animais infectados com a bactéria *Flavobacterium columnare*; G. Estreptococose crônica; H. meningoencefalite causada por *Streptococcus*.

Fonte: Santiago Benites de Pádua

Os tratamentos comumente utilizados para o combate das infecções bacterianas são os antibióticos, que foram criados para inibir o crescimento (bacteriostático) e/ou matar (bactericida) as bactérias patogênicas (BURRIDGE et al., 2010). Estes produtos podem ser empregados tanto na forma terapêutica como na profilática.

Alguns dos antibióticos mais usados na tilapicultura são: amoxicilina, sulfatiazida em conjunto com trimetoprim, oxitetraciclina, enrofloxacina e florfenicol (RICO et al., 2013, 2014). Opta-se geralmente pelo uso de drogas que apresentem amplo espectro de ação (BURRIDGE et al., 2010).

No entanto, os antibióticos devem ser usados de forma racional, restrita e regulada para não acarretar problemas para saúde humana e animal, devendo ser administrados em situações clínicas específicas e prescritos por profissionais capacitados (MILLANAO et al., 2011). Caso contrário, o uso indiscriminado destes produtos pode acarretar diversos problemas, entre os quais, seleção de bactérias resistentes no ambiente, causando desequilíbrios biológicos (RHODES et al., 2000), e seleção de cepas resistentes (GHOSH; MANDAL, 2010), sem contar o maior custo de tratamento, morbidade e mortalidade de infecções causadas por estes micro-organismos (CABELLO, 2003).

É neste cenário que o uso de probióticos se torna relevante, já que métodos alternativos ao uso de drogas para o tratamento de doenças na aquicultura vêm ganhando força, e o uso de tecnologias para melhorar a saúde humana e animal, por meio de soluções naturais, tornam-se cada vez mais popular (LAUZON et al., 2014).

1.3 Probióticos

O termo probiótico é derivado das palavras gregas “pro” e “bios” e significa “para a vida. Eles se referem a micro-organismos vivos que, suplementados na dieta, afetam benéficamente o hospedeiro animal, melhorando o balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). Para Gatesoupe (1999), probióticos são células microbianas administradas de modo a entrar no trato gastrointestinal, onde se mantêm vivas, com o intuito de melhorar a saúde. Adicionalmente, Mouriño et al. (2012) sugerem que esses micro-organismos benéficos que entram no trato digestivo dos animais, mantêm-se vivos e possuem a habilidade de melhorar a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas.

Para que esses micro-organismos sejam considerados probióticos, algumas características são imprescindíveis: reduzir ou

eliminar micro-organismos patogênicos, não causar resistência, colonizar o trato digestório, manterem-se vivos por longo tempo, além de possuir resistência à ação de enzimas digestivas (CORNÉLIO, 2013).

Entre as bactérias probióticas utilizadas na aquicultura, citam-se os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Clostridium* (NAYAK, 2010). Leveduras também podem ser utilizadas para esse fim, pois algumas possuem capacidade de colonizar o trato intestinal de diversos animais em condições experimentais, destacando-se a *Rhodotorula glutinis*, *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae* (GATESOUBE et al., 2007).

Os probióticos atuam diretamente nos animais e suas funções são: contribuição enzimática, aumentando a eficiência alimentar (BAIRAGI et al., 2002), melhoria dos parâmetros zootécnicos, como ganho de peso, taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar e consumo de ração (STANDEN et al., 2016) e alteração morfofisiológica do trato gastrointestinal (MELLO et al., 2013). Eles agem no balanço da relação entre bactérias benéficas e patogênicas, diminuindo as possibilidades de entrada de patógenos (MOURIÑO et al., 2012), e possuem a capacidade de atuar como promotores do sistema imune (TELLI et al., 2014).

Diante desses benefícios, o uso dos probióticos é cada vez mais empregado na tilapicultura, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1- Espécies de bactérias utilizadas como probióticos, concentrações, tempo de fornecimento e principais efeitos mensurados em tilápia-do-nilo.

Micro-organismo	Concentrações	Tempo	Efeito mensurado	Referência
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4,6x10 ⁸ UFC·mL ⁻¹	35 dias	Incremento da produtividade, eficiência alimentar e peso final.	JATOBA; MOURIÑO (2015)
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> e <i>Bacillus subtilis</i> C-3102	5x10 ⁸ (500 milhões de esporos por grama)	127 dias	Colonização intestinal e influência no perfil hematológico.	GARCIA – MARENGONI et al (2015)
<i>Bacillus subtilis</i>	5 x 10 ⁶ UFC·g ⁻¹	84 dias	Efeito positivo nos parâmetros hematológicos e imunológicos.	TELLI et al (2014)
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> e <i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i> 5x10 ⁹ UFC·g ⁻¹ 1 e <i>B. subtilis</i> C-3102 10x10 ⁹ UFC·g ⁻¹	7 meses (210 dias)	<i>B. subtilis</i> influencia negativamente a eficiência de retenção de nutrientes.	WILD et al (2014)
<i>Bacillus toyoi</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. toyoi</i> 4x10 ⁸ UFC·g ⁻¹ e <i>B. subtilis</i> 4x10 ⁸ UFC·g ⁻¹	63 dias	Melhora na imunidade e colonização intestinal.	NAKANDAKARE et al (2013)
<i>Bacillus cereus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. cereus</i> 4x10 ⁸ UFC·g ⁻¹ e <i>B. subtilis</i> 4x10 ⁸ UFC·g ⁻¹	80 dias	Interferência no percentual de sobrevivência relativa; aumento da altura e largura das vilosidades, espessura das células epiteliais de revestimento e número de células caliciformes; interferência positiva quanto aos teores de proteína e extrato etéreo das carcaças.	MELLO et al (2013)

Continuação da Tabela 1

<i>Lactobacillus plantarum</i>	1×10^9 UFC·mL ⁻¹	15 dias	Migração celular para o sítio inflamatório, incremento de células da linhagem branca no exudato inflamatório e aumento da atividade fagocítica.	DOTTA et al (2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,15 \times 10^{-7}$ UFC·g ⁻¹	70 dias	Indução de alterações morfológicas na mucosa intestinal.	CARVALHO et al (2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	1×10^9 UFC·g ⁻¹	30 dias	Colonização intestinal	TACHIBANA et al (2011)

O uso de probióticos apresenta diversos efeitos positivos mensuráveis (Tabela 1). Salinas et al. (2005), no entanto, notaram aumento da capacidade citotóxica, isto é, indícios de que seu uso pode prejudicar o funcionamento celular em pargos *Sparus aurata* L. alimentados com dieta suplementada com probiótico. A exemplo do que acontece com probióticos, alguns autores também perceberam efeitos deletérios pelo aumento das concentrações de ácidos orgânicos (citrato de sódio) em dietas para tilápia *Oreochromis* sp. (ROMANO et al., 2016). Por isso é imprescindível a determinação e padronização de concentrações e o tempo de fornecimento dessas substâncias para espécies cultivadas na aquicultura.

A técnica de histologia é uma das ferramentas utilizadas para verificar os efeitos das concentrações e dos tempos de fornecimento destes produtos sobre os tecidos. Ela possibilita, por exemplo, o entendimento das estruturas normais e patológicas apresentadas por determinado tecido, concedendo informações anatômicas em nível celular.

As alterações histológicas observadas podem ser negativas (de caráter reversível ou irreversível) ou positivas. As reversíveis ou adaptativas são caracterizadas pela capacidade de retorno do tecido ao seu estado original quando cessado o estímulo danoso. Como exemplos dessa alteração, citam-se hipertrofia, hiperplasia, atrofia, metaplasia, tumefação celular e degeneração gordurosa. Se o estímulo persistir ou for demasiado intenso é possível levar a alterações teciduais irreversíveis, cujo processo se encaminha para a morte celular como apoptose e necrose (JONES, HUNT; KING, 2000).

As alterações benéficas provocadas pela utilização de probióticos podem ser observadas em diversos órgãos. Por exemplo, no trato gastrointestinal, podem influenciar a altura e a largura das vilosidades, a espessura das células epiteliais de revestimento e o número das células caliciformes da mucosa (MELLO et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie mais produzida em nível mundial, apresentando relevância econômica e nutricional sendo uma importante fonte proteica. Os probióticos são amplamente utilizados na tilapicultura no mundo, no entanto, a escassez de informações acerca da padronização das concentrações utilizadas e a maneira por meio da qual estas substâncias podem afetar o organismo animal suscitam dúvidas de como estes micro-organismos atuam. O presente estudo visa utilizar ferramentas, como a hematologia e histologia, assim como a aferição dos índices zootécnicos apresentados pelos animais, para determinar como o organismo hospedeiro responde aos estímulos causados pelas diferentes concentrações de *Lactobacillus plantarum*. A relevância deste trabalho reside em fornecer informações práticas para a formulação de probióticos a partir desta bactéria.

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento sobre o uso de probióticos para a tilapicultura.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se a suplementação de três diferentes concentrações (10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹) de probiótico contendo *Lactobacillus plantarum* afeta os índices zootécnicos, hematológicos e histológicos da tilápia-do-nylo;
- Caracterizar as alterações histológicas em rim, fígado, baço e intestino de tilápia-do-nylo suplementada com *L. plantarum* na ração;
- Realizar a morfometria dos vilos intestinais de tilápia-do-nylo suplementada com *L. plantarum* na ração;

CAPÍTULO 1

Influência da suplementação dietética de *Lactobacillus plantarum* em diferentes órgãos da tilápia-do-nilo

O artigo será enviado para publicação no periódico **Aquaculture Nutrition** (ISSN: 1365-2095), tendo sido redigido segundo as normas da revista.

Influência da suplementação dietética de *Lactobacillus plantarum* em diferentes órgãos da tilápia-do-nilo

Effect of dietary supplementation of *Lactobacillus plantarum* in different organs of tilapia - the - nile

M.L. RUIZ, M.M YAMASHITA, J.V.S. FERRAREZI, P. GARCIA & J.L.P. MOURIÑO

AQUOS - Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

*Corresponding author: Ruiz ML, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Brazil, Tel: +55 48 37219923; E-mail: mluizaruiz@gmail.com

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação com diferentes concentrações do probiótico *Lactobacillus plantarum* e seus efeitos sobre os índices zootécnicos, hematológicos e histológicos da tilápia-do-nilo. Foram utilizados 240 juvenis distribuídos em 16 tanques com aeração constante, sistema de recirculação contínuo, quatro tratamentos em quadruplicata: controle (sem suplementação), 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ por kg de dieta contendo *L. plantarum*. Após 35 dias, constatou-se que a suplementação probiótica não influenciou os parâmetros zootécnicos e hematológicos. Nos rins, entretanto, houve redução da presença de células granulocíticas especiais LG – PAS entre as coletas (15 e 35 dias). O fígado apresentou menores danos com relação ao aspecto cordonal no tratamento 10^8 UFC·g⁻¹ aos 15 dias; já para os tratamentos 10^4 e 10^8 UFC·g⁻¹ houve menor grau de congestão aos 35 dias. O probiótico atuou também na redução do número de centros de melanomacrófagos no tecido esplênico, além de aumentar a quantidade de células caliciformes encontradas nas vilosidades intestinais.

Palavras chave: tilapicultura, sanidade aquícola, profilaxia, probiótico, histologia, desempenho produtivo.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the supplementation with different concentrations of *Lactobacillus plantarum* and their effects on husbandry, hematological and histological indexes for Nile tilapia. 240 juveniles were distributed in 16 tanks with constant aeration, continuous recirculation system, and separated in quadruplicate: control (non supplemented), 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU \cdot g⁻¹ per kg of diet containing *L. plantarum*. After 35 days, it was found that the probiotic supplementation does not affect the zootechnical and hematological parameters. In the kidneys, however, there were a reduction of the presence of special granulocytic cells LG - PAS between collections (15 and 35 days). The liver showed minor damage in relation to cordon aspect in fish fed 10^8 CFU \cdot g⁻¹ on day 15; and fish fed 10^4 and 10^8 CFU \cdot g⁻¹ showed lower degree of congestion on day 35. The probiotic also had the ability to reduce the number of melanomacrophages centers in splenic tissue, and increase the amount of goblet cells found in the intestinal villi.

Keywords: tilapia culture, aquaculture health, prophylaxis, probiotic, histology, productive performance

Introdução

O cultivo de tilápias é o tipo de aquicultura mais disseminada, sendo encontrada em 135 países e territórios, em todos os continentes (FAO, 2014). A maior tecnificação possibilitou a intensificação produtiva, no entanto, más condições sanitárias, alta densidade de estocagem, manipulação descomedida e inapropriada, bem como o descarte incorreto dos animais mortos podem ser citados como fatores que favorecem o surgimento de doenças na aquicultura (Millanao et al. 2011).

Dentre todas as doenças, as bacterioses na tilapicultura, quando associadas a fatores predisponentes, podem causar grandes surtos de mortalidade, responsáveis por extensas perdas econômicas nos cultivos. Neste contexto, os probióticos vêm ganhando força como método alternativo ao uso de drogas para tratamento e profilaxia de doenças na aquicultura. Eles são micro-organismos benéficos que possuem a habilidade de melhorar a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas no hospedeiro (Mouriño et al. 2012). As bactérias probióticas mais utilizadas na aquicultura são as ácido-láticas, das quais se destaca o *Lactobacillus plantarum*. Esta é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos (Dash et al. 2015) e que possui efeitos benéficos comprovados por diversos autores (Carnevali et al.

2004; Vieira et al. 2010; Kongnum & Hongpattarakere, 2012; Dash et al. 2014).

Porém, a escassez de informações sobre as melhores concentrações destes micro-organismos, bem como de seus efeitos nos animais, dificulta a utilização dessa tecnologia. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da bactéria probiótica ácido-lática *L. plantarum* suplementada na dieta em três diferentes concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ e seus efeitos sobre os parâmetros zootécnicos, hematológicos e histológicos para a tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*.

Material e métodos

Material biológico

Foram utilizados 240 juvenis de tilápia-do-nilo com comprimento médio de $5,83 \pm 0,83$ cm e peso médio de $3,72 \pm 1,48$ g, provenientes da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri – Balneário Camboriú/Santa Catarina, Brasil.

Foi utilizada a bactéria *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 227 – 08 DRM) isolada do trato intestinal de tilápias do Nilo sadias e assintomáticas, tendo seu potencial probiótico demonstrado por Jatobá et al. (2008).

Preparo da dieta experimental suplementada com probiótico

A cepa de *L. plantarum* foi mantida em tubos de ensaio contendo caldo MRS, Man, Rogosa e Sharpe (Kasvi, Itália), reativada em placas de Petri com o meio MRS Ágar (Kasvi, Itália) acrescido de 1% de azul de anilina e incubada a 35 °C por 48 h. Para o preparo do inóculo bacteriano e determinação de sua concentração, as bactérias crescidas após 24 h nos tubos contendo MRS caldo tinham sua concentração averiguada por meio do leitor de microplacas (Biochrom® Asys Expert Plus, United Kingdom) no comprimento de onda de 630 nm em curva de crescimento previamente mensurada.

Após a determinação da concentração inicial, o inóculo foi centrifugado a 1800 rpm (centrífuga 5804 R, Eppendorf, Alemanha) rotor FA-45-6-30 (6x50 mL) durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano suspenso em solução salina estéril 0,65% para realização da diluição e determinação das concentrações desejadas.

Os inóculos bacterianos foram confeccionados semanalmente e adicionados diariamente à ração comercial Nicoluzzi® (proteína bruta de 400 g·kg⁻¹, extrato etéreo de 80 g·kg⁻¹, matéria fibrosa de 35 g·kg⁻¹ e

matéria mineral de $200 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) na proporção de $100 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ração, 20 min antes de cada alimentação. Os animais não suplementados receberam uma dieta acrescida com solução salina estéril a 0,65% como forma de controle. As dietas experimentais foram semeadas em meio de cultura MRS com azul de anilina (1%) semanalmente como forma de controle e garantia do fornecimento das concentrações bacterianas desejadas na dieta.

Foram realizadas biometrias semanais para o ajuste da quantidade de ração a ser ofertada. A porcentagem de ração por peso vivo no trato diário e o número de arraçoamento eram determinados com base na tabela nutricional fornecida pela empresa Nicoluzzi Indústria de Rações Ltda. que cedeu a ração. Os animais foram mantidos por 35 dias, realizando-se a primeira coleta com 15 dias de experimento e a segunda ao final do período.

Condições experimentais

Os animais foram distribuídos em 16 tanques com volume útil de 32 l, com aeração constante, sistema de recirculação contínuo composto por filtro mecânico e biológico, filtro UV e fotoperíodo de 12 h. O desenho experimental consistiu em três tratamentos: 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC $\cdot\text{g}^{-1}$ de dieta e um controle (sem suplementação), em quadruplicata com delineamento inteiramente casualizado. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFSC) sob o protocolo PP00928.

Parâmetros físico-químicos da água

A aferição dos principais parâmetros de qualidade da água foi realizada diariamente no período matutino, às 9:00 h por meio dos testes colorimétricos Ecolit (Alfakit, Brasil). A temperatura média foi de $26,35 \pm 1,30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH de $6,40 \pm 0,93$, amônia total de $0,14 \pm 0,13 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, nitrito de $0,13 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ e nitrato de $2,50 \pm 0,00 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ durante todo o período experimental.

Índices zootécnicos

As pesagens iniciais e finais foram realizadas através de pools, perfazendo a média do peso total de animais por cada caixa. Ganho de peso, eficiência e conversão alimentares, foram determinados de acordo com as fórmulas:

$$\text{Ganho de peso} = \frac{\text{peso médio final (g)}}{\text{peso médio inicial (g)}}$$

$$\text{Eficiência alimentar} = \frac{\text{ganho de peso médio por peixe (g)}}{\text{ração fornecida por peixe (g)}}$$

$$\text{Conversão alimentar} = \frac{\text{consumo de ração (g)}}{\text{ganho de peso médio (g)}}$$

Análise hematológica

Os animais foram anestesiados com eugenol (75 mg·l⁻¹) e o sangue coletado por punção do vaso caudal com seringa de 3 ml (BD PlastipakTM, Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda., Brasil) e agulha hipodérmica 20 x 0,55 mm (Labor Import, handong Weigao Co. Ltd., China) contendo solução anticoagulante Hemstab EDTA 10% (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). As alíquotas sanguíneas foram utilizadas para determinar o número total de eritrócitos (RBC) (Martins et al. 2004) e o percentual de hematócrito (Ranzani–Paiva et al. 2013). A contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (Ishikawa et al. 2008). Para a contagem diferencial dos leucócitos, cem células foram quantificadas a partir de extensões sanguíneas coradas com MayGrunwald/Giemsa/Wright (Ranzani–Paiva et al. 2013).

Análise histológica

Após eutanásia por aprofundamento anestésico, rim, fígado, baço e intestino foram retirados e fixados em formalina 10% tamponada. As amostras foram desidratadas em graduação progressiva de álcool, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Com auxílio de micrótomo PAT- MR10 (O Patologista, Brasil), foram realizados cortes de 3 µm, posteriormente corados com hematoxilina de Harrys e eosina (HH & E) para identificação padrão das estruturas foi utilizada a metodologia adaptada de (Howard et al. 2004). No rim, os parâmetros avaliados foram presença ou ausência de necrose, hipertrofia e necrose da cápsula de Bowman, degenerações hialina, hidrópica e tubular, hipertrofia tubular, congestão glomerular, alterações de núcleo como cariólise e picnose, presença de LG – PAS e infiltrado inflamatório de células mononucleares. Para a realização das análises hepáticas, foram observadas as seguintes alterações: necrose, manutenção do aspecto cordonal, rompimento da membrana citoplasmática, hipertrofia de

hepatócitos, dilatação sinusoidal, colestase, esteatose, infiltrado inflamatório, congestão, hemorragia na região do hepatopâncreas e alterações de núcleo como ausência e hipertrofia.

A quantificação dos centros de melanomacrófagos no baço foi realizada a partir da técnica de contagem de pontos por meio da graticula de Weibel (1963) acoplada a microscópio óptico, tendo a metodologia adaptada de Garcia e Magalhães (2008).

Em relação ao intestino, comprimento, largura, diâmetro e perímetro dos vilos foram mensurados com auxílio do software Zen Pro, em μm , e quantificados o número de células caliciformes e de vilos, em microscópio Dic (Differential Interference Contrast) modelo Axio Imager A2 (Zeiss, Alemanha).

Análises estatísticas

Para os índices zootécnicos, hematológicos e histomorfométricos intestinais foi realizada ANOVA unifatorial e, de acordo com a homocedasticidade, avaliada pelo teste de Bartlett. Os dados não homocedásticos foram transformados em Log e a separação de médias foi realizada pelo teste de Duncan. As alterações histológicas foram submetidas ao teste qui-quadrado ou ao teste exato de Fisher de acordo com o N amostral e o erro padrão dos valores obtidos. A análise do tamanho e do número de centros de melanomacrófagos foi realizada por ranqueamento, cuja comparação foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal - Wallis. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 95%, com auxílio do Software Statistica 10.0[®].

Resultados

Índices zootécnicos

Após 35 dias de suplementação com *L. plantarum* não houve diferença significativa com relação aos índices zootécnicos para tilápia-do-nilo (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de peso, eficiência alimentar e conversão alimentar de tilápia-do-nilo suplementada com *Lactobacillus plantarum* nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ por 15 e 35 dias¹

Tempo de suplementação (dias)	Concentrações (UFC·g ⁻¹)	Ganho de peso	Eficiência alimentar	Conversão alimentar
15	Controle	2,43 ± 0,73	0,32 ± 0,07	3,23 ± 0,70
	10 ⁴	3,24 ± 0,87	0,43 ± 0,09	2,44 ± 0,67
	10 ⁶	3,02 ± 0,37	0,39 ± 0,05	2,57 ± 0,37
	10 ⁸	2,80 ± 0,87	0,39 ± 0,07	2,62 ± 0,49
35	Controle	9,40 ± 2,24	0,54 ± 0,08	1,89 ± 0,27
	10 ⁴	10,04 ± 1,28	0,57 ± 0,04	1,75 ± 0,11
	10 ⁶	10,89 ± 1,59	0,61 ± 0,21	1,65 ± 0,21
	10 ⁸	9,41 ± 2,10	0,56 ± 0,07	1,79 ± 0,22

¹ Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. A ausência de letras indica que não há diferença significativa entre os tratamentos (p>0,05).

Índices hematológicos

Em ambas coletas (15 e 35 dias), não foram observadas diferenças significativas relacionadas à série vermelha sanguínea, tanto na contagem de eritrócitos quanto no percentual de hematócrito (Tabela 2). O mesmo foi observado na contagem total e diferencial para a série branca, trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos (Tabela 3).

Tabela 2. Valores hematológicos em tilápia-do-nilo suplementada com *Lactobacillus plantarum* nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ por 15 e 35 dias¹

Tempo de suplementação (dias)	Concentrações (UFC·g ⁻¹)	Eritrócitos (x10 ⁶ μL ⁻¹)	Hematócrito (%)
15	Controle	1,80 ± 0,41	25,38 ± 6,48
	10 ⁴	1,49 ± 0,39	24,71 ± 5,15
	10 ⁶	1,58 ± 0,33	22,75 ± 7,54
	10 ⁸	1,54 ± 0,46	27,00 ± 5,61
35	Controle	1,79 ± 0,40	24,75 ± 6,50
	10 ⁴	1,89 ± 0,33	25,86 ± 4,56
	10 ⁶	1,70 ± 0,35	26,75 ± 4,89
	10 ⁸	1,74 ± 0,23	23,88 ± 2,53

¹ Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. A ausência de letras indica que não há diferença significativa entre os tratamentos (p>0.05).

Tabela 3. Valores hematológicos da série branca, contagem total e diferencial, de tilápias do Nilo suplementada com *Lactobacillus plantarum* nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ por 15 e 35 dias¹

Tempo de suplementação	Concentrações (UFC·g ⁻¹)	Leucócitos (x10 ³ ·µL ⁻¹)	Trombócitos (x10 ³ ·µL ⁻¹)	Linfócitos (x10 ³ ·µL ⁻¹)	Neutrófilos (x10 ³ ·µL ⁻¹)	Monócitos (x10 ³ ·µL ⁻¹)	Células Jovens (x10 ³ ·µL ⁻¹)
15 dias	Controle	51,23 ± 28,77	8,74 ± 6,21	88,09 ± 20,77	0,84 ± 0,87	1,03 ± 1,46	63,46 ± 23,29
	10 ⁴	44,04 ± 21,16	5,25 ± 5,42	73,24 ± 19,00	0,46 ± 0,60	0,94 ± 1,74	78,90 ± 49,18
	10 ⁶	34,98 ± 12,40	4,11 ± 2,48	76,29 ± 17,18	1,72 ± 1,20	1,15 ± 1,04	72,04 ± 35,34
	10 ⁸	40,48 ± 19,39	4,28 ± 5,03	74,56 ± 21,07	1,02 ± 1,25	1,51 ± 3,04	72,45 ± 71,15
35 dias	Controle	46,65 ± 19,44	1,61 ± 2,23	83,20 ± 18,41	5,17 ± 7,52	1,35 ± 1,63	47,12 ± 22,86
	10 ⁴	83,66 ± 50,53	5,36 ± 3,06	89,49 ± 17,11	4,45 ± 2,23	0,31 ± 0,54	32,59 ± 15,70
	10 ⁶	50,93 ± 16,85	5,34 ± 6,01	83,04 ± 16,35	1,35 ± 1,83	0,72 ± 1,35	39,13 ± 17,35
	10 ⁸	80,04 ± 45,78	7,88 ± 6,20	82,00 ± 11,43	4,58 ± 5,75	0,20 ± 0,38	32,34 ± 15,02

¹ Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. A ausência de letras indica que não há diferença significativa entre os tratamentos (p>0,05).

Análise histológica

A análise histológica do rim, mostrou aumento das células LG – PAS ($\chi^2=8,02$; GL=3; $P<0,05$), (Figura 1A), nos primeiros 15 dias de suplementação com o tratamento 10^4 UFC·g⁻¹ de dieta, apresentando valores de 25% (1 de 4) com relação ao controle 14,2% (1 de 7) com $p = 0,048$.

No tecido hepático, o aspecto cordonal dos hepatócitos ($\chi^2=13,50$; GL=3; $P<0,05$) apresentou menores alterações aos 15 dias de suplementação com o tratamento 10^8 UFC·g⁻¹ 37,5% (3 de 8) em comparação com o 10^6 UFC·g⁻¹ 62,5% (5 de 8) $p= 0,025$ e com o controle 100% (8 de 8) $p = 0,025$.

Após 35 dias de suplementação dietária, os animais alimentados com 10^4 UFC·g⁻¹ 37,5% (3 de 8) e 10^8 UFC·g⁻¹ 25% (2 de 8) apresentaram menor grau de congestão hepática ($\chi^2=9,80$; GL=3; $P<0,05$) (Figura 1B) do que aqueles não suplementado 100% (8 de 8), com valores de significância de $p = 0,037$ e $p = 0,011$, respectivamente. Neste mesmo período, a colestase - acúmulo de bilirrubina hepática ($\chi^2=9,95$; GL=3; $P<0,05$) foi maior no tratamento 10^8 UFC·g⁻¹ 75% (6 de 8) do que no 10^4 UFC·g⁻¹ 25% (2 de 8), com $p = 0,006$.

Para o baço não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, mas o mesmo resultado não foi observado entre os períodos, uma vez que o número de centro de melanomacrófagos (Figura 1C-D) foi significativamente maior aos 15 dias ($5,38 \pm 3,41$) com $p = 0,035$.

Como demonstrado na Tabela 3, os valores referentes a comprimento, largura e perímetro intestinais (Figura 1E) não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os números de células caliciformes, de vilos e o diâmetro intestinal encontram-se na Tabela 4. Maior número de células caliciformes (Figura 1F) foi observado nos animais suplementados com a bactéria probiótica na concentração 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ ao final do período experimental.

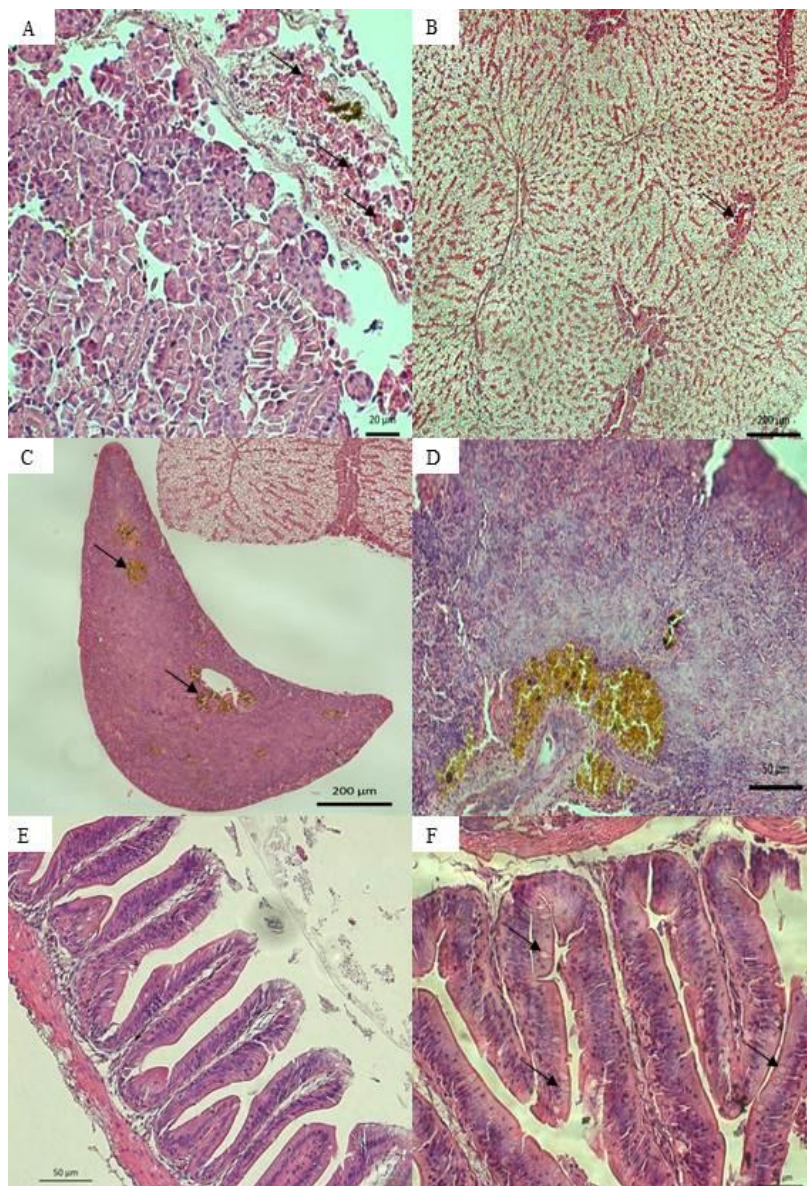


Figura 1. A. Tecido renal com infiltrado de LG-PAS (setas); B. Tecido hepático com congestão (seta); C. Tecido esplênico apresentando centros de melanomacrófagos (setas); D. Detalhe de centro de melanomacrófago em tecido esplênico; E. Vilosidades intestinais; F. Células caliciformes (setas).

Tabela 4. Comprimento, largura e perímetro da secção intermediária do intestino de tilápia-do-nilo após a suplementação com *Lactobacillus plantarum* nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC·g⁻¹ e no grupo controle para 15 e 35 dias¹

Tempos de suplementação (dias)	Concentração (UFC·g ⁻¹)	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Perímetro (µm)
15	Controle	158,19±172,43	57,14±39,19	393,86±447,23
	10^4	105,23±66,97	49,02±20,69	221,03±140,93
	10^6	105,72±31,37	49,12±15,66	214,15±60,04
	10^8	143,90±67,68	51,17±14,72	281,82±140,14
35	Controle	138,61±52,78	65,04±22,94	282,24±111,44
	10^4	106,58±29,60	60,45±12,30	218,32±65,58
	10^6	140,47±36,62	63,02±20,93	289,68±89,02
	10^8	116,24±42,86	60,61±11,35	244,45±81,79

¹ Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. A ausência de letras indica que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

Tabela 5. Número de células caliciformes (CC), número de vilos e diâmetro intestinal (μm) da secção intermediária do intestino de tilápia-do-nilo após a suplementação com *Lactobacillus plantarum* nas concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC. g^{-1} para 15 e 35 dias¹

Tempos de suplementação (dias)	Concentração (UFC. g^{-1})	Número de CC	Número de vilos	Diâmetro (μm)
15	Controle	9,25 \pm 9,85	24,50 \pm 8,00	579,73 \pm 132,6
	10^4	8,57 \pm 9,45	24,14 \pm 8,33	658,16 \pm 177,94
	10^6	8,38 \pm 11,66	24,50 \pm 7,12	765,60 \pm 44,39
	10^8	19,57 \pm 15,86	23,29 \pm 7,40	625,41 \pm 185,63
35	Controle	17,16 \pm 16,54 ^b	22,75 \pm 4,39	798,96 \pm 145,40
	10^4	24,40 \pm 15,89 ^{ab}	22,67 \pm 6,40	757,37 \pm 295,06
	10^6	38,51 \pm 15,06 ^a	24,00 \pm 3,26	756,65 \pm 273,65
	10^8	39,74 \pm 12,46 ^a	21,60 \pm 2,70	827,80 \pm 145,65

¹ Os valores estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p = 0,036$), entre as diferentes concentrações. A ausência de letras indica que não há diferença significativa entre os tratamentos.

Discussão

A suplementação dietária com *L. plantarum* não influenciou o desempenho zootécnico dos animais no presente estudo. Da mesma maneira, Silva et al. (2015), utilizando *Bacillus amyloliquefaciens* nas concentrações de 1×10^6 UFC·g⁻¹; 5×10^6 UFC·g⁻¹ e 1×10^7 UFC·g⁻¹, e Garcia-Marengoni et al. (2015), com *B. cereus* var. *toyoi* e *B. subtilis* C-3102 na concentração de 5×10^8 (500 milhões de esporos por grama), também não observaram melhora no desempenho produtivo de tilápias suplementadas com probióticos, mas notaram melhoras na estrutura e colonização intestinais. Portanto, o uso de alguns probióticos, apesar de não contribuir com os dados zootécnicos, pode melhorar outros indicadores de saúde apresentados pelos animais, assim como no presente estudo.

Em trabalhos em que suplementos alimentares são testados, a hematologia é uma ferramenta importante capaz de inferir acerca do estado de saúde dos animais tratados e do efeito das condições experimentais a que eles estejam submetidos. No presente estudo não foram registradas alterações significativas nas contagens de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes. Resultados similares foram encontrados por Merrifield et al. (2010a), que não constataram diferenças significativas na contagem diferencial de leucócitos e contagem total de trombócitos em truta arco-íris suplementada com *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Enterococcus faecium*. Diferentemente, Talpur (2014) observou aumento do número total de leucócitos em *Channa striata* suplementada com *Lactobacillus acidophilus* na concentração de 1×10^{10} UFC·kg⁻¹, indicando possível efeito imunoestimulante.

Os granulócitos LG – PAS, apresentadas no tecido renal, são células sanguíneas comumente observadas em focos inflamatórios (Ranzani-Paiva et al. 2013). O aumento no número destas células nos peixes suplementados com 10^4 UFC·g⁻¹ após 15 dias não foi observado ao final do período experimental, sugerindo que o probiótico possivelmente apresentou efeitos positivos sobre o sistema imune sem o desencadeamento de resposta inflamatória prejudicial (Saad, 2006).

No fígado, observou-se que os animais suplementados apresentaram menores danos com relação ao aspecto cordonal e menor grau de congestão quando comparados com os não suplementados, observando-se. A colestase, por sua vez, é atribuída a falha do organismo em excretar pigmentos biliares, sendo a excreção deste componente dependente de solubilidade em água (Pacheco & Santos,

2002), foi maior no tratamento 10^8 UFC·g⁻¹ quando comparada com 10^4 UFC·g⁻¹.

No entanto, nos animais do presente estudo, o acúmulo de bilirrubina não necessariamente indica um grau elevado de severidade, na medida em que não foram observadas conjuntamente alterações nos parâmetros hematológicos, levando em consideração a presença da bilirrubina no produto final do catabolismo da hemoglobina (Mattsoff & Oikari, 1986). Diferentemente, Romano *et al.* (2016), avaliando o uso do ácido orgânico citrato de sódio durante 50 dias para tilápia, notaram que os animais suplementados apresentaram danos hepáticos como hemorragias, necrose e respostas inflamatórias.

Apesar de o rim e o fígado apresentarem diversas lesões, ressalta-se que tanto os peixes não suplementados como os suplementados exibiram em grau leve (acometimento de 0-25% do órgão), e com distribuição que variou de focal a multifocal. Sendo assim, infere-se que o probiótico *L. plantarum* atuou de maneira benéfica no organismo dos animais suplementados, não sendo capaz de promover danos teciduais ao ponto de interferir nas funções renais e hepáticas.

No baço, a redução do número de centros de melanomacrófagos, subtipo de macrófagos pigmentados encontrados em teleósteos, principalmente nos rins, fígado, baço e ocasionalmente nas brânquias, cérebro e gônadas (Wen, 2016), pode estar relacionada ao possível aumento da imunidade possibilitada pela suplementação com a bactéria ácido-lática, bem como pela adaptação dos animais ao sistema de recirculação. Estes centros geralmente servem de apoio aos tecidos hematopoiéticos, podem se desenvolver em casos que envolvam lesões inflamatórias crônicas, atuam na destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, atuam como indicadores de estresse ambiental e ainda podem estar relacionados ao desenvolvimento de resposta imune à antígenos bacterianos (Agius & Roberts, 2003).

Assim como no presente estudo, Pirarat *et al.* (2011) também notaram que para tilápias suplementadas com *Lactobacillus rhamnosus*, utilizando a contagem de placa no ágar MRS a uma taxa de 10^{10} UFC·g⁻¹, a população das células de muco intestinal no grupo teste foi significativamente maior do que no controle. Da mesma forma, Mello *et al.* (2013) concluíram que o uso de *B. subtilis* e *B. cereus* na concentração de 4×10^8 UFC·g⁻¹ provocou aumento no número de células caliciformes. O aumento no número células caliciformes é uma característica benéfica da suplementação com bactérias ácido-láticas, uma vez que aumentam a produção de muco. O muco intestinal forma um gel que se adere ao epitélio constituindo a primeira linha de defesa

contra agressões mecânicas, químicas e danos causados por toxinas bacterianas e enzimas que possam prejudicar a integridade do epitélio intestinal (Finnie *et al.* 1995; Gaudier *et al.* 2009).

Merrifield *et al.* (2010b) também observaram que o comprimento dos microvilos não foi afetado na suplementação com *Bacillus* spp. e *Enterococcus faecium* para truta arco-íris na concentração de 10^7 UFC·g⁻¹, resultado que pode estar correlacionado com os diferentes padrões de colonização bacteriana. Similar com o presente estudo Carvalho *et al.* (2011), também não verificaram incremento do número de vilosidades na tilápia, suplementada com *B. subtilis* $4,15 \times 10^7$ UFC·g⁻¹. Ferguson *et al.* (2010), também observaram que a relação do perímetro no intestino anterior e posterior dos animais suplementados não diferiu do grupo controle para tilápias suplementadas com *Pedococcus acidilactici* na concentração 1×10^7 UFC·g⁻¹.

Apesar de não terem sido notadas diferenças significativas com relação ao comprimento, largura, perímetro, número de vilos e diâmetro intestinais, ressalta-se que o probiótico não induziu dano tecidual e/ou inflamação intestinal.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram que a suplementação com *L. plantarum* para tilápia-do-nilo apresentou-se benéfica, na medida em que aumentou a quantidade de células caliciformes presentes nas vilosidades intestinais, não causou danos teciduais nos rins, fígado, baço e intestino e não influenciou os parâmetros zootécnicos e hematológicos. A concentração de 10^8 UFC·g⁻¹ apresentou os melhores resultados, pois aumentou o número de células caliciformes, melhorou o aspecto cordonal e reduziu a congestão hepática.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro e bolsa de Produtividade em Pesquisa a J.L.P. Mouriño (CNPq 308292/1014-6), e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado a M.L. Ruiz. A EPAGRI/Camboriú (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) que gentilmente cederam os peixes e a Nicoluzzi Indústria de Rações Ltda., Penha/Santa Catarina por ceder a ração utilizada no experimento.

Referências

- Agius, C. & Roberts, R.J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.*, **26**, 499-509.
- Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A.M & Cresci, A. (2004) Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquac. Int.*, **12**, 377-386.
- 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) The performance and intestinal morphometry of tilapia fingerlings fed mannanoligosaccharides and “*Bacillus subtilis*”. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, **12**, 176-187.
- Dash, G., Raman, R.P., Prasad, K.P., Makesh, M., Pradeep, M.A. & Sem, S. (2014) Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture*, **432**, 225-236.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcázar, J.L. & Davies, S.J. (2010) The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 851-862.
- Finnie, I.A., Dwarakanath, A.D., Taylor, B.A. & Rhodes, J.M. (1995) Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*, **36**, 93-99.
- Garcia, P.; Magalhães, A.R.M. (2008) Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. *Bol. Inst. Pesca*, **34**, 11-19.
- Garcia-Marengoni, N., Moura, M.C., Oliveira, N.T.E., Bombardelli, R.A. & Menezes-Albuquerque, D. (2015) Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. *LAJAR*, **43**, 601-606.
- Gaudier, E., Rival, M.; Buisine, M.-P., Robineau, I. & Hoebler, C. (2009) Butyrate Enemas Upregulate Muc Genes Expression but Decrease Adherent Mucus Thickness in Mice Colon. *Physiol. Res.*, **58**, 111-119.
- Howard, D.W., Lewis E.J., Keller, B.J. & Smith, C.S. (2004) Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. *NOAA Technical Memorandum NCCOS*, **5**, 1-218.

- Ishikawa, N. M., Ranzani-Paiva, M. J. T. & Lombardi, J. V. (2008) Total leukocyte counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Vet. Sci.*, **13**, 54-63.
- Jatobá, A., Vieira, F.N., Neto, C.B., Silva, B.C., José Luís Pedreira 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, **43**, 1201-1207.
- Kongnum, K. & Hongpattarakere, T. (2012) Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.*, **32**, 170-177.
- Martins, M. L., Pilarsky, F., Onaka, E. M., Nomura, D. T., Fenerick, J., Ribeiro, K., Myiazaki, D. M. Y., Castro, M. P. & Malheiros, E. B. (2004) Hematologia e resposta inflamatória em *Oreochromis niloticus* submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca*, **30**, 71-80.
- Mattsoff, L. & Oikari, A. (1987) Acute hyperbilirubinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) caused by resin acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88C**, 263-268.
- Mello, H., Moraes, J.R.E., Niza, I.G., Moraes, F. R., Ozório, R.O.A., Shimada, M.T., Filho, J.R.E. & Claudiano, G.S. (2013) Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq. Vet. Bras.*, **1**, 724-730.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M. & Davies, S.J. (2010a) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquac. Nutr.*, **16**, 496-503.
- Merrifield, D.L., Harper, G.M., Dimitroglou, A., Ring, E. & Davies, S.J. (2010b) Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquac. Res.*, **41**, 1268-1272.
- Millanao, B.A., Barrientos, H.M., Gómez, C.C., Tomova, A., Buschmann, A., Dölz, H. & Cabello, F.C. (2011) Injudicious and excessive use of antibiotics: Public health and salmon aquaculture in Chile. *Rev. Méd.*, **139**, 107-118.
- Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Silva, B.C., Vieira, F.N. & Martins, M.L. (2012) Probióticos na Aquicultura. *Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos*, 1st edn, pp. 381 – 404, Maringá: Massoni.

- Pacheco, S. & Santos, M.A. (2002) Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **53**, 331-347.
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N. & Maita, M. (2011) Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res. Vet. Sci.*, **91**, 92-97.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Pádua, S.B., Tvaes-Dias, M., Egami, M.I. (2013) Métodos para análise hematológica em peixes., 1st edn, pp. 46-68 Eduem Maringá.
- Romano, N., Chong, C.M., Simon, W., Kamarudin, M.S. & Ebrahimi, M. (2016) Dietary sodium citrate improved oxidative stability in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) but reduced growth, health status, intestinal short chain fatty acids and induced liver damage. *Aquaculture*, **458**, 170-176.
- Saad, S.M.I. (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Braz. J. Pharm. Sci.* **42**, 1-16.
- Silva, T.F.A., Petrillo, T.R., Yunis-Aguinaga, J., Marcusso, P.F., Claudiano, G.S., Moraes, F.R. & Moraes, J.R.E. (2015) Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, **43**, 963-971.
- Talpur, A.D., Munir, M.B., Mary, A. & Hashim, R. (2014) Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture*, **14-20**, 426-427.
- Vieira, F.N., Buglione, C.C., Mouriño, J.P.L., Jatobá, A., Martins, M.L., Schleder, D.D., Andreatta, E.R., Barraco, M.A. & Vinatea, L.A. (2010) Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **62**, 631-638.
- Weibel, E.R. (1963) Principles and methods for morphometrical study of the lung and other organs. *Lab Investig*, **12**, 131-155.
- Wen, C.-M. (2016) Development and characterization of a cell line from tilapia head kidney with melanomacrophage characteristics. *Fish Shellfish Immunol.*, **49**, 442-449.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos complementares devem ser realizados a fim de verificar os efeitos de maiores amplitudes de concentrações probióticas. Adicionalmente, recomenda-se investigar o desempenho dos animais suplementados e não suplementados frente a desafios com bactérias patogênicas, com intuito de determinar a resposta imune frente ao estímulo danoso. Sugere-se, ainda, aumentar o tempo de administração do probiótico, para fins de avaliação dos parâmetros analisados. Com isso é possível determinar de maneira mais precisa a concentração probiótica a ser utilizada para tilápia-do-nilo.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish. 5º edição, P. 119-228 Springer, 2012.

BAIRAGI, A.; GHOSH, K.S.; SEM, S.K.; RAY, A.K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10(2), p.109- 21, 2002.

BEVERIDGE, M.C.M.; STEWART, J.A. Cage culture: limitations in lakes and reservoirs. **FAO Fisheries Technical Paper**, n. 374, Rome, 1998.

BOYD, C. E. (1997) Manejo do solo e da qualidade da água em viveiros de aqüicultura. Tradução de Eduardo Ono. Saint Louis: **American Soybean Association**

BURRIDGE, L.; WEIS, J.S.; CABELLO,F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**. v. 306 (1-4), p. 7-23, 2010.

CABELLO, F.C. Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. Fundacion Terram. **Analisis de Politicas Publicas**. v. 1 (17), p. 1-16, 2003.

CAMPOS, M.D.; GANECO, L.N.; CASTELLANI, D.; MARTINS, M.I.E. Avaliação econômica da criação de tilápias em tanque-rede, município de Zacarias, SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33(2), p. 265-271, 2007.

CANONICO, G.C.; ARTHINGTON, A.; JEFFREY K. MCCRARY, J.K.; THIEME, M.L. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems**, v. 15, p. 463-483, 2005.

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. The performance and intestinal morphometry of tilapia fingerlings fed

mannanligosaccharides and “*Bacillus subtilis*”. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12 (1), p. 176-187, 2011.

CORNÉLIO, F.H.G.; CARGNIN-FERREIRA, E.; BORBA, M.R.; MOURIÑO, J.L.P.; FERNANDES, V.A.G.; FRACALOSSO, D.M. Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48 (8), p.863-870, 2013.

DE SILVA, S.S; SUBASINGHE, R.P.; BARTLEY, D.M.; LOWTHER, A. Tilapias as alien aquatics in Asia and the Pacific: a review. **FAO Fisheries Technical Paper**, Rome, p.65 (453), 2004.

DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; TURNBULL, J. F.; CHARLIER, G. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. **Journal of Fish Diseases**, v. 22 (1), p. 1–11, 1999.

DeLONG, D.P; LOSORDO, T.M; E. RAKOCY, J.E. Tank Culture of Tilapia. **SRAC Publication**, n.282, 2009.

DONG, H.T.; NGUYEN, V.V.; LE, H.D.; SANGSURIYA, P.; JITRAKORN,S.; SAKSMERPROME, V.; SENAPIN,S.; RODKHUM,C. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. **Aquaculture**. v. 448 (1), p. 427–435, 2015.

DOTTA, G.; MOURIÑO, J.L.P; JATOBÁ, A.; MORÁN, R.E.B; PILATI, C.; AND MARTINS, M.L. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33 (3), p. 239-246, 2011.

EL-SAYED, A-F. M. Tilápia Culture. **CAB Publishing**. v.1, p.17-40, 2006.

EMATER. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação. **Índices zootécnicos para cultivo de peixes no estado de Goiás**. Goiânia, GO, 2012. Disponível em: <http://www.emater.go.gov.br/intra/wp-content/uploads/downloads/2013/05/Indice_ZOO_PISCI_atualizado_2012.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2016.

EPAGRI. Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. **Desempenho da piscicultura de água doce**. Florianópolis, SC, 2015. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/wpcontent/uploads/2013/08/Desempenho_da_Piscicultura_de_Agua_Doce_2015.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. Roma, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>> Acesso em: 10 mar. 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. Roma, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013 – Summary information**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4899e.pdf>>. Acesso em: em: 10 mar. 2016.

FARIA, R.H.S.; MORAIS, M.; SORANNA, M.R.G.S.; SALLUM, W.B. Manual de criação de peixes em viveiro. **Companhia de Desenvolvimento dos Vales São Francisco e do Parnaíba – Codevasf**, Brasília, 2013.

FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, United States. v.2, p. 253-264, 2000.

FOUZ, B.; ALCAIDE,E.; BARRERA, R.; AMARO, C. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). **Aquaculture**, v. 212 (1-4), p. 21-30, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p.365-378, 1989.

GARCIA-MARENGONI, N.; MOURA, M.C.; OLIVEIRA, N.T.E.; BOMBARDELLI, R.A.; MENEZES-ALBUQUERQUE, D. Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the

diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. **Latin american journal of aquatic research**, v. 43 (3), p. 601-606, 2015.

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

GATESOUBE, F.J. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. **Aquaculture**, v. 267 (1-4), p. 20-30, 2007.

GHOSH, K.; MANDAL, S. Antibiotic Resistant Bacteria in Consumable Fishes from Digha coast, West Bengal, India. **Proceedings of the Zoological Society** v.63 (1), p. 13–20, 2010.

IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, RJ, 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2016.

IREGUI, C.A; GUARÍN, M.; TIBATÁ, V.M.; FERGUSON, H.W. Novel brain lesions caused by *Edwardsiella tarda* in a red tilapia (*Oreochromis* spp.). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24(2), p. 446–449, 2012.

JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J.L.P. *Lactobacillus plantarum* effect on intestinal tract of *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Ciencia animal brasileira**, v.16 (1), p-45-53, 2015.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Células: morte das células e dos tecidos. **Veterinary Pathology**. 1ª ed, v.1, p. 1-25, 2000.

KAWARAZUKA, N.; BÉNÉ, C. The potential role of small fish species in improving micronutrient deficiencies in developing countries: building evidence. **Public Health Nutrition**. v. 14(11), p. 1927–1938, 2011.

LAUZON, H.L.; DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L; RINGO, E.; Simon J. DAVIES, S.J. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. **Aquaculture nutrition: gut health, probiotics, and prebiotics**. v.1, p. 167 – 184, 2014.

LEAL, C.A.; TAVARES, G.C.; FIGUEREDO, H.C. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p. 574-5712, 2014.

LEWBART, G. A. "Bacteria and ornamental fish." **Seminars in avian and exotic pet medicine**. v. 10 (1), p. 48-56, 2001.

MARTINS, ML.; MOURIÑO, JLP.; AMARAL, GV.; VIEIRA, FN.; DOTTA, G.; JATOBÁ, AMB.; PEDROTTI, FS.; JERÔNIMO, GT.; BUGLIONE-NETO, CC.; PEREIRA-JR., G. Alterações hematológicas em tilápia-do-nilo infectada experimentalmente com *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68 (3), p. 657-661, 2008.

MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; FILHO, J.R.E.; CLAUDIANO, G.S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 1, p. 724-730, 2013.

MILLANAO, B. A.; BARRIENTOS, H. M.; GÓMEZ, C. C.; TOMOVA, A.; BUSCHMANN, A.; DÖLZ, H.; CABELLO, F.C. Injudicious and excessive use of antibiotics: Public health and salmon aquaculture in Chile. **Revista Médica de Chile** v. 139 (1), p. 107-118, 2011.

MORAES, A.M.; SEIFFERT, W.Q.; TAVARES, F.; FRACALOSSI, D.M. Performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in cages and fed with different commercial diets. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40 (3), p. 388-395, 2009.

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

MOURIÑO, J.L.P.; JATOBÁ, A.; SILVA, B.C.; VIEIRA, F.N.; e MARTINS, ML. Probióticos na Aquicultura. **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. v.1, p. 381 – 404, 2012.

NAKANDAKARE, I.B; IWASHITA, M.K.P; DIAS, D.C; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-Nilo:

parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39(2), p.121 – 135, 2013.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41 (11), p. 1553-1573, 2010.

NEGRONI, G. Tilapia Farming Guide. NPH Haiti / **Fondazione Rava**. v.1, p.1-45, 2013.

NG, W.-K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, p. 220–254, 2013.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia Life History and Biology. **SRAC Publication**, n. 283, 1999.

RHODES, G., HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; ANDPICKUP, R.W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.3883–3890, 2000.

RICO, A.; PHU, T.M.; SATAPORNVANIT, K.; MIN, J.; SHAHABUDDIN, A.M.; HENRIKSSON, P.J.G.; MURRAY, F.J.; LITTLE, D.C.; DALSGAARD, A.; BRINK, P.J.V.D. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. **Aquaculture**, v. 412-413, p.231-243, 2013.

RICO, A.; OLIVEIRA, R.; MCDONOUGH, S.; MATSER, A.; KHATIKARN, J.; SATAPORNVANIT, K.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M.; DOMINGUES, I.; BRINK, P.J.V.D. Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. **Environmental Pollution**, v. 191, p. 8-16, 2014.

ROMANO, N.; CHONG, C.M.; SIMON, W.; KAMARUDIN, M.S.; EBRAHIMI, M. Dietary sodium citrate improved oxidative stability in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) but reduced growth, health status,

intestinal short chain fatty acids and induced liver damage. **Aquaculture**, v.458, p.170-176, 2016.

MESEGUER, J. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 19 (1), p. 67-77, 2005.

SILVA, P.C.; KRONKA, S.N.; TAVARES, L.H.S. JÚNIOR, R.P.S.; SOUZA, V.S. Avaliação econômica da produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em sistema "raceway". **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 25 (1), p. 9-13, 2003.

SILVA, B.C.; MARTINS, M.L.; JATOBÁ, A.; NETO, C.C.B.; VIEIRA, F.N.; PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q.; José Luiz P. MOURIÑO, J.L.P. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29 (11), p. 874-880, 2009.

STANDEN, B.T.; PEGGS, D.L.; RAWLING, M.D.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; SANTOS, G.A.; MERRIFIELD, D.L. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 49, p 427-435, 2016.

TACHIBANA, L.; DIAS, D.C.; ISHIKAWA, C.M.; CORRÊA, C.F.; LEONARDO, A.F.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Probiotic in the feed of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) during sex reversal: zootechnical performance and the recovery of probiotic bacteria in the intestine. **Bioikos**, v. 25(1), p.25-31, 2011.

TAVARES, G.C.; F.A.A.; SANTOS, R.R.D.; BARONY, G.M.; LEAL, C.A.G.; FIGUEIREDO, H.C.P. Nonlethal sampling methods for diagnosis of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 454 (1), p. 237-242, 2016.

TELLI, G.S.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; DIAS, D.C.; SUSSEL, F.R.; ISHIKAWA, C.M.; TACHIBANA, L. Dietary administration

of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. **Fish and Shellfish Immunology**, v.39, p. 305–311, 2014.

TROELL, M.; NAYLOR, R.L.; METIAN, M.; BEVERIDGE, M.; TYEDMERS, P.H.; FOLKE, C.; ARROW, K.J. Scosilience to the global food system? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.111, p. 13257–13263, 2014.

WILD, M.B.; MARENGONI, N.G.; VIVIAN, M.M.P.S.; TSUTSUMI, C.Y.; MOURA, M.C. Dietary Probiotic in production systems of Nile tilapia: effect on growth, balance of N and P nutrient retention and economic viability. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35 (1), p. 477-490, 2014.