

Fernando Henrique Gomes Cornélio

Avaliação da suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Florianópolis - SC  
2009



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Agrárias  
Departamento de Aquicultura  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Avaliação da suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico,  
digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno  
em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao programa  
de Pós-Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como parte dos requisitos necessários  
para a obtenção do título de Mestre em  
Aquicultura

Orientadora: Débora Machado Fracalossi  
Co-orientador: Eduardo Cargnin Ferreira

**Fernando Henrique Gomes Cornélio**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cornélio, Fernando Henrique Gomes

Avaliação da suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Fernando Henrique Gomes Cornélio – 2009.

46 f : 6 figs., 11 tabs.

Orientadora: Débora Machado Fracalossi

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1.*Oreochromis niloticus*; 2.Digestibilidade; 3.Desempenho zootécnico; 4.Probióticos.

**Avaliação da suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).**

Por

FERNANDO HENRIQUE GOMES CORNÉLIO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa da Pós-Graduação em Aqüicultura.

---

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira - *Presidente*

---

Dr. Eduardo Cargnin Ferreira

---

Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

---

Dr. Julio Hermann Leonhardt

## **AGRADECIMENTOS**

A minha namorada Mariana Aquilante Policarpo, pelo apoio, incentivo, momentos de felicidade, paciência e ajuda durante os trabalhos.

Aos meus pais, Rita Maria Gomes Cornélio e Fernando Albertine Cornélio, minha irmã Ana Livia e vovó Ana, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos Rodrigo, Patrícia, Renato, Michele, Ana, Vítor, Giovanni, Ricardo, Ronaldo e Maria do Carmo, pelos momentos agradáveis juntos e à ajuda durante o trabalho.

À professora orientadora Débora Machado Fracalossi e ao co-orientador Eduardo Carginin Ferreira, pela paciência e aprendizado.

Ao Carlito Aloísio Klunk pela organização e paciência em ajudar os alunos.

À Nicoluzzi Rações Ltda pelo fornecimento das rações.

Aos funcionários e colaboradores do LAPAD.

Ao CNPQ pela bolsa de estudo recebida.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
<i>Criação de Tilápias</i> .....	8
Tilápia do Nilo.....	9
<i>Problemas na Piscicultura</i> .....	10
<i>Os Probióticos</i> .....	11
<i>Forma de Ação dos Probióticos</i> .....	11
<i>Aplicações dos Probióticos</i> .....	13
<i>Isolamento de Cepas Probióticas</i> .....	13
JUSTIFICATIVA.....	15
OBJETIVO GERAL.....	15
<i>Objetivos Específicos</i> .....	15
CAPÍTULO I.....	16
Avaliação no desempenho zootécnico, resistência à infecção por patógeno e digestibilidade de nutrientes em tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) após suplementação dietética com a bactéria ácido-lática ( <i>Lactobacillus plantarum</i> ) como probiótico.....	16
Introdução .....	17
Materiais e Métodos.....	18
<i>Suplementação da ração comercial com probiótico e alimentação dos peixes</i> .....	18
<i>Ensaio de crescimento</i> .....	19
<i>Desafio com bactéria patogênica</i> .....	19
<i>Ensaio de digestibilidade</i> .....	19
<i>Análise histológica dos intestinos</i> .....	20
<i>Análises proximais da ração, fezes e composição corporal dos peixes</i> .....	20
<i>Análise estatística</i> .....	22
Resultados e Discussão.....	22
Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO II.....	29
Condicionamento da água com probiótico a base de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no desempenho e resistência à infecção por patógeno para tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ), e sua suplementação na ração para avaliação da digestibilidade de nutrientes.....	29
Introdução .....	30
Materiais e Métodos.....	31
<i>Ensaio de crescimento</i> .....	31
<i>Desafio com bactéria patogênica</i> .....	31
<i>Ensaio de digestibilidade</i> .....	32
<i>Histologia dos intestinos</i> .....	33
<i>Análises proximais das rações, fezes e composição corporal dos peixes</i> .....	33
<i>Análise estatística</i> .....	34
Resultados e Discussão.....	34
Referências Bibliográficas.....	39
CONCLUSÕES GERAIS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	42

## RESUMO

Existem evidências que probióticos são uma alternativa importante ao uso de antibióticos e quimioterápicos na criação animal. No entanto, o conhecimento sobre a atuação dos probióticos na aquicultura ainda é escasso. Este estudo avaliou a suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, resistência à infecção após desafio com patógeno, digestibilidade de nutrientes da dieta e histologia do intestino (anterior, médio e posterior) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os probióticos testados foram o produto comercial Aquayeast®, (*Saccharomyces cerevisiae*) e um probiótico experimental, composto pela bactéria ácido-lática (*Lactobacillus plantarum*), isolada do trato gastrointestinal da própria tilápia. Peixes com peso inicial médio de  $2,4 \text{ g} \pm 1,0$  e  $230 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$  foram utilizados nos ensaios de crescimento e digestibilidade, respectivamente. A suplementação com os probióticos promoveu uma melhora significativa no desempenho e sobrevivência da tilápia após desafio com o patógeno *Aeromonas hydrophila*. Porém, somente a suplementação da dieta com o probiótico a base de levedura promoveu um aumento significativo na digestibilidade da proteína, matéria seca e energia. Não houve alterações morfológicas no trato digestório dos peixes após suplementação com os diferentes probióticos por 55 dias e a colonização do trato gastrointestinal pelos microorganismos foi comprovada através de histologia.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, probióticos, desempenho zootécnico, digestibilidade, desafio

## ABSTRACT

There is growing evidence that probiotics are an important alternative to the use of antibiotics and quimiotherapics in animal husbandry. However, the knowledge about the effects of probiotic supplementation in aquaculture is still scarce. This study evaluated the supplementation of different probiotics on the performance, resistance to infection after pathogen challenge, dietary nutrient digestibility and histology of the intestine (foregut, midgut and hindgut) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The probiotics tested were the commercial product Aquayeast® (*Saccharomyces cerevisiae*), and an experimental probiotic (*Lactobacillus plantarum*), isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia. Average initial weight of fish used in the growth and digestibility trials with both probiotics were  $2.4 \text{ g} \pm 1.0 \text{ g}$  and  $230 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ , respectively. The supplementation with the probiotics has promoted a significant improvement in growth and survival after challenging with the pathogen *Aeromonas hydrophila*. However, only the yeast probiotic promoted a significant increase in the dietary digestibility of protein, dry matter and energy. There were no morphologic alterations in the digestive tract after supplementation with the different probiotics for 55 days, and the colonization of the gastrointestinal tract by the microorganisms was confirmed by histology.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*, probiotics, growth, digestibility, challenge

## INTRODUÇÃO

### **Criação de Tilápias**

De acordo com Lovshin (1998), as tilápias apresentam-se como o segundo grupo de peixes de maior importância na aquicultura mundial. Há registro histórico do cultivo de tilápias em cativeiro pelos egípcios, há dois mil anos antes de Cristo (BALARIN; HALLER, 1982). No entanto, o crescimento da atividade intensificou-se somente no século XX. A China, que possui tradição milenar em aquicultura é o maior produtor de tilápia do mundo, com aproximadamente 900.000 toneladas/ano, estando o Brasil em sétima colocação, com aproximadamente 70.000 t, conforme dados de 2006 (FAO, 2007) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais produtores mundiais de tilápia em 2006 (FAO, 2007).

País	Produção (t)
China	897.276
Egito	199.078
Filipinas	145.869
Indonésia	139.651
Tailândia	97.653
Taiwan	89.275
Brasil	69.078

Tilápia é a denominação comum de algumas espécies de peixes ciclídeos que, de acordo como se distribuem originalmente do centro-sul da África até o norte da Síria (POPMA; PHELPS, 1998). Existem aproximadamente 100 espécies de tilápia, distribuídas em três gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (MCANDREW, 2000). Todavia, apenas cerca de 22 espécies de tilápias são cultivadas no mundo, sendo as principais a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia mossâmbica (*O. mossambicus*), a tilápia azul (*O. aureus*), *O. macrochir*, *O. hornorum*, *O. galilaeus*, *Tilapia zillii* e a *T. rendalli* (EL-SAYED, 1999).

No Brasil, a criação de tilápias teve início com a introdução de um plantel de *Tilapia rendalli*, na década de 1950 (GODOY, 1959), o qual, devido ao baixo desempenho em crescimento, foi seguido de uma nova introdução de tilápia do Nilo em 1972 (DA SILVA; MELO; LOVSHIN, 1975). A tilapicultura firmou-se como atividade empresarial a partir da década de 1980, após surgimento de técnicas de reversão sexual e introdução de linhagens de maior potencial zootécnico; foi quando surgiram os empreendimentos pioneiros (KUBTIZA, 2000; ZIMMERMANN, 2000).

Lund e Figueira (1989) salientaram algumas qualidades que tornam as tilápias um dos peixes com maior potencial para a piscicultura: estes peixes alimentam-se dos itens básicos da cadeia trófica, aceitam uma grande variedade de alimentos, respondem com mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem vegetal e animal, apresentam resposta positiva à fertilização dos viveiros, são

bastante resistentes a enfermidades, suportam baixos teores de oxigênio dissolvidos na água, desovam durante todo ano nas regiões mais quentes do país, além de apresentarem um bom aproveitamento de rações artificiais. Proença e Bittencourt (1994) também destacam as boas características sensoriais e nutricionais da tilápia, tais como: carne saborosa, baixo teor de gordura, ausência de espinhos em forma de “Y” e rendimento de filé de 35% a 40% (em exemplares com peso médio de 450 g), o que facilita seu processamento nas indústrias de beneficiamento.

Em 2005, a produção de tilápia incrementou em 38% a produção total de peixes oriunda de aquicultura no Brasil (IBAMA; 2007). Entre os peixes criados, é a que apresenta maior produção aquícola, seguida das carpas (23,8%) e do tambaqui (14%) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Produção dos principais peixes oriundos de aquicultura no Brasil (IBAMA, 2007).

<b>Peixes</b>	<b>Produção (%)</b>
Tilápia	38
Carpa	23,8
Tambaqui	14
Tambacu	6,1
Pacu	5,1
Piau	2,3
Tambatinga	1,4
Truta	1,3
Outras	8
<b>Total</b>	<b>100</b>

### Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo é o segundo peixe de água doce mais cultivado em todo o mundo, ficando atrás apenas das carpas (BORGUETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003).

No Brasil, a tilápia do Nilo possui grande destaque por ser uma espécie precoce que apresenta excelente desempenho em diferentes sistemas de criação (WAGNER et al., 2004 apud CYRINO et al., 1998), desde extensivo, semi-intensivo em tanques que recebem dejetos animais, até em cultivos intensivos em tanque-rede. O comprimento e o peso máximo registrados para esta espécie foram de 60 cm (ECCLES, 1992) e de aproximadamente 5 kg (IGFA, 2001), respectivamente. A principal característica que distingue a espécie *Oreochromis niloticus* é a presença de listras por todo comprimento da nadadeira caudal (ECCLES, 1992). É uma espécie onívora (PHILIPPART e RUWET, 1982) que se alimenta de detritos, algas verdes e cianofíceas, diatomáceas, macrófitas e bactérias (BOWEN, 1982).

Atualmente, a tilápia do Nilo é considerada a espécie mais importante na piscicultura continental mundial por apresentar inúmeras características positivas para sua criação, tais como: rusticidade, fácil reprodução, programa de melhoramento genético e, principalmente, mercado (FITZSIMMONS, 2000). Por ser uma espécie precoce, resistente a patologias e baixos teores de oxigênio, esta espécie mostrou ser apropriada para a piscicultura de subsistência, sofrendo um rápido aumento em seu cultivo nos países em desenvolvimento (LOVSHIN, 1998).

Vários são os produtos industrializados derivados da tilápia, como peixe eviscerado com e sem pele e cabeça, isca, lingüiça, *fishburger*, carne moída, espetinho, kibe e bolinhos, farinhas, asinha, além de bolsas e acessórios de couro de peixe. Entretanto, o produto nobre e mais apreciado nacionalmente e internacionalmente é o filé, em função de suas características sensoriais e nutricionais (MEURER, 2005).

### ***Problemas na Piscicultura***

A aquicultura mundial destaca-se como um dos setores da produção animal em elevada expansão. Nesta última década, obteve um crescimento anual médio cinco vezes superior às atividades tradicionais agrícolas, superior à avicultura, suinocultura e produção de bovinos (BORGUETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003; IBAMA, 2007). Em 2005, a produção aquícola brasileira respondeu por 25,6% da produção total de pescado (257.780 t), sendo os principais produtores as regiões Sul, Nordeste e Sudeste. Dentre os diferentes cultivos continentais, a piscicultura foi responsável por 99,4% ou 178.746,5 t do total produzido (IBAMA, 2007). Com o crescimento da piscicultura intensiva, observa-se o aumento da ocorrência de enfermidades (COSTA, 2003), pois peixes ficam mais expostos a patógenos oportunistas. Diversos fatores tais como regime alimentar, qualidade da água, ou mesmo o manejo, pode determinar mudanças na composição da microbiota intestinal que induzem à proliferação desses patógenos, provocando uma enfermidade (VERSCHUERE et al., 2000; WINTON, 2001).

Para evitar perdas, tanto em mortalidade quanto em desempenho, piscicultores adicionam antibióticos ou outros quimioterápicos no cultivo, com o intuito de inibir ou reduzir a proliferação de patógenos, na tentativa de prevenir qualquer tipo de infecção (NAYAK et al., 2007). No entanto, no Brasil, não há fiscalização adequada para que o uso dessas substâncias seja controlado na aquicultura. Desta forma, muitas vezes estes produtos são utilizados de forma indevida, sem prescrição de dosagem, períodos de tratamento e períodos de carência (HISANO et al., 2006). Entretanto, o conhecimento e respeito a estas restrições são fundamentais, pois visam a melhor ação do medicamento e sua eliminação, de forma a não comprometer com resíduos o produto final e o meio ambiente.

Um dos graves problemas da má utilização dos antibióticos é que, além de causar malefícios à saúde dos consumidores, promove a seleção de bactérias resistentes, causando um grande impacto ecológico (LEWIN, 1992; HISANO et al., 2006). Com isso, vários estudos estão sendo desenvolvido para oferecer alternativas ao uso dessas substâncias. Em 2001, Menten destacou a proibição destas substâncias pela União Européia, em função da resistência provocada em patógenos importantes para seres humanos, por causar reações de hipersensibilidade e até mesmo por possuírem propriedades cancerígenas. Dentre as alternativas, surge a utilização de probióticos, que tem por objetivo estabilizar uma determinada população bacteriana em condições ideais de normalidade (OWINGS et al., 1990; JONES, 1991), favorecendo o desempenho zootécnico e resistência dos animais pela sua capacidade de atenuar os desafios do ambiente de cultivo.

### **Os Probióticos**

A denominação de probiótico foi feita pela primeira vez em 1965, por Lilly e Stillwel, que a utilizaram para nomear uma substância secretada por um determinado protozoário que causou crescimento a outros. Já em 1999, Gatesoupe definiu probiótico para aquicultura como sendo suplementos derivados de microorganismos, os quais são adicionados ao cultivo com o propósito de colonizar o trato digestório dos animais, melhorando a saúde destes.

Mais recentemente, em 2001, Schrezenmeir e Vrese sugeriram que o termo probiótico deve ser usado para produtos que contenham determinados microrganismos vivos, em quantidade adequada para promover a alteração da microbiota, por implantação ou colonização de um hospedeiro. Essa alteração deverá produzir efeitos positivos na saúde do hospedeiro, através do estímulo de sua microbiota, reduzindo ou eliminando a incidência de microorganismos patógenos.

Entretanto, para que exista essa colonização é necessária a aplicação constante e frequente do probiótico, para que os microrganismos nele contidos sejam dominantes no sistema aquático. Assim, os microrganismos que estiverem presentes em maior quantidade influenciarão a microbiota do intestino do hospedeiro (FULLER, 1992). Após a instalação definitiva de uma microbiota no ambiente, somente a adição de altas doses de probiótico provocará sua colonização artificial, a qual será apenas temporariamente dominante. Em animais adultos, a população de microrganismos oriundos de probióticos no trato gastrointestinal decresce alguns dias após sua ingestão (FULLER, 1992).

Como relatado por diversos autores (HAVENAAR; BRINK; HUIS INT'VELD, 1992; SALMINEN; OUWEHAND; ISOLAURI, 1998; OUWEHAND et al., 1999; SAARELA et al., 2000; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002), certas características são imprescindíveis para que um microorganismo possa se tornar um probiótico e agir de forma eficiente no trato digestório de uma espécie alvo, tais como:

- Ter capacidade de colonização do trato digestório.
- Possuir resistência à ação da bile, secreções pancreáticas e intestinais, às variações de pH, principalmente do suco gástrico, bem como ao sistema imunológico do hospedeiro.
- Manter-se vivo por longo tempo, durante transporte, armazenamento, para que possam colonizar o hospedeiro eficientemente.
- Não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos.
- Possuir propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas.
- Reduzir ou eliminar a presença de microorganismos patógenos no hospedeiro.

Vários microorganismos já são utilizados como probióticos e outros vem sendo testados por apresentar propriedades probióticas (Tabela 3).

### **Forma de Ação dos Probióticos**

Vários estudos foram publicados nos últimos anos sobre o uso de probióticos na produção animal, incluindo a produção de camarões (GARRIQUES e AREVALO, 1995; MORIARTY, 1997), peixes (DE SCHRIJVER; OLLEVIER, 2000; SUZER et al., 2008), frangos (CORREA et al., 2002; SILVA; ANDREATTI, 2000) e suínos (JORGENSEN, 1989; KORNIEWICZ, 1992). Entretanto, devido

**Tabela 3.** Alguns microorganismos com propriedades probióticas. Adaptado de Holzapfel et al. (2001).

Bactérias ácido-lácticas dos gêneros		Outras bactérias ácido-lácticas	Outros microorganismos
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>		
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> (var. toyoi)
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Echerichia coli</i> (cepa nissle)
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasserii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

a limitações metodológicas ou mesmo de ética no uso de animais, o modo de ação dos probióticos é pouco conhecido (BALCÁZAR et al., 2006). Alguns modos de ação foram sugeridos nos estudos acima citados, os quais podem atuar independentemente ou de forma associada:

**Exclusão competitiva:** os probióticos competem com outros microorganismos, possíveis patógenos, por locais de adesão na parede do sistema digestório (sítios de ligação), onde formam uma barreira física, além de competir por nutrientes e energia. Este modo de ação explicaria a necessidade do fornecimento freqüente e em grande quantidade dos probióticos, para uma ação efetiva.

**Aumento da imunocompetência:** os probióticos possuem a capacidade de melhorar o sistema imune, mas o exato mecanismo de ação ainda não está elucidado (CROSS, 2002). Pode haver estímulo do sistema imune não específico, havendo aumento da atividade fagocitária de leucócitos (SAKAI et al., 1995) e ativação de macrófagos (KATO; YOKOKURA; MUTAI, 1983). Em humanos, foi verificado que a administração oral de *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) estimula e altera a atividade de macrófagos, células T e células B, resultando na mudança de vários parâmetros imunológicos, como produção de citocinas pelos linfócitos, proliferação de células B e de células *natural killer*, produção de IgM e IgG e ativação da atividade fagocítica de leucócitos (MATSUZAKI; CHIN., 2000; YOKOKURA et al., 1999). Em humanos foi demonstrado que o *Lactobacillus casei*, juntamente com as bifidobactérias, aumentaram a produção de IgA, fortalecendo a barreira da mucosa intestinal (LAIHO et al., 2002). Alguns trabalhos relatam um aumento na resistência (maior sobrevivência, aumento da resposta imune) de animais suplementados com probióticos após sofrerem algum tipo de desafio com patógenos (CASTRO; CERVON 2004; VIEIRA et al., 2007; KUMAR et al., 2008; RENGPIPAT et al., 2000; BALCÁZAR, 2003; PIRARAT et al., 2006).

**Produção de substâncias antibacterianas:** certos microorganismos produzem substâncias que diminuem ou cessam o crescimento de bactérias patogênicas, tais como: bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiónico, acético, butírico, láctico) (FULLER, 1989). Em estudo realizado por Jatobá e colaboradores (2008), foi demonstrado

claramente esse mecanismo de ação. Algumas cepas de bactérias ácido-láticas, isoladas de espécimes de tilápia do Nilo, inibiram o crescimento de patógenos *in vitro*, o que foi constatado pela formação de um halo ao redor de discos de agar impregnados com as cepas de bactérias supostamente “benéficas”.

*Fornecimento de nutrientes e/ou auxílio no processo de digestão e absorção de nutrientes:* Sakata (1990), Dall e Moriarty (1983) e Fuller (1989) relataram que a suplementação com alguns probióticos pode contribuir para a melhora na nutrição dos animais, mediante o fornecimento de ácidos graxos, vitaminas e aminoácidos. Alguns autores ainda descrevem que certos microorganismos utilizados como probióticos podem beneficiar os processos digestivos, através da produção de enzimas extracelulares como lipases, proteases (PRIEUR et al., 1990; WANG et al., 2000), lactase (DE VRESE et al., 2001), celulase e amilase (WANG, 2007).

#### Aplicações dos Probióticos

Os probióticos são utilizados na alimentação humana por promover vários benefícios para a saúde, como redução do risco de várias doenças intestinais, cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes tipo 2, além de possuir ação antiinflamatória e melhorar a digestibilidade de nutrientes (NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999; SIMHON et al., 1982; KANAMORI et al., 2001). Na criação animal, os probióticos são utilizados como promotores de crescimento, proporcionando um aumento geral na produção e redução na mortalidade causada por patógenos (VERSCHUERE et al., 2000; WANG et al., 2008).

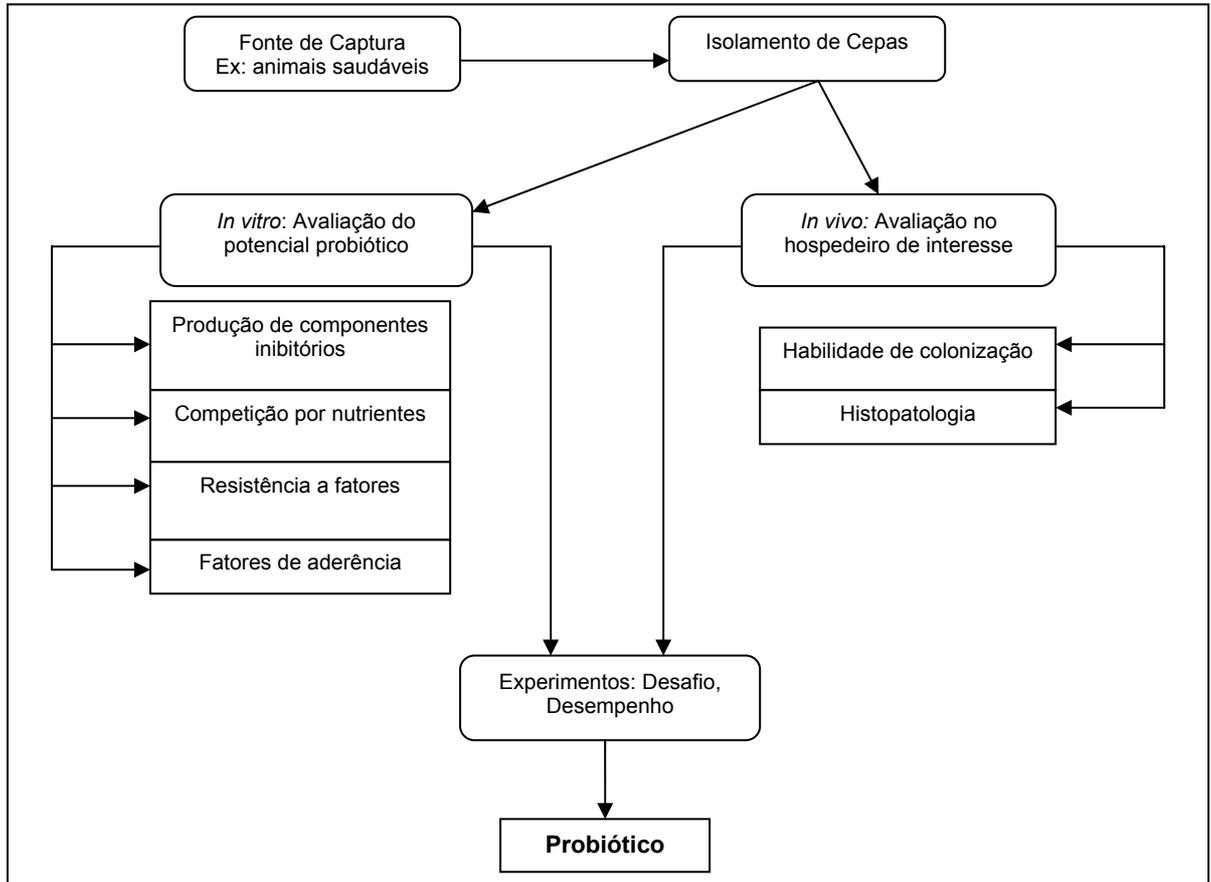
Na aquicultura, foi demonstrado que promovem uma melhora no ganho em peso, conversão alimentar e aproveitamento dos nutrientes da ração, além de beneficiar o ambiente de cultivo com a melhoria da qualidade de água (GATESOUBE, 1999; BALCÁZAR et al., 2006; WANG, 2007). Os probióticos podem ser oferecidos como suplemento adicionado na ração, enriquecimento de alimento vivo ou diretamente na água de cultivo. A melhoria da qualidade de água pode estar associada à presença bactérias gram-positivas, pois estas convertem a matéria orgânica em CO<sub>2</sub> de forma mais eficiente que as bactérias gram-negativas. Durante o ciclo de produção, altos níveis de bactérias gram-positivas na água podem minimizar o acúmulo de carbono orgânico dissolvido (DALMIN; KATHIRESAN; PURUSHOTHAMAN, 2001).

#### Isolamento de Cepas Probióticas

Para a utilização de um microorganismo como suplemento, é necessário que este seja isolado, caracterizado e que sejam realizados testes para comprovar sua eficiência probiótica, como sumarizado na Figura 1. Primeiramente, é selecionada uma fonte de microorganismos, por exemplo: trato digestório de animais e humanos, sucos e fermentados de frutas, leite, alimentos, etc. O segundo passo é o isolamento e identificação dos microorganismos com os quais se pretende trabalhar, através da utilização de meios de cultura seletivos. Após a identificação, faz-se uma nova cultura apenas com as colônias de interesse para realização de testes *in vitro*, como inibição de patógenos, teste de patogenicidade na espécie alvo, resistência às condições existentes nos hospedeiros (enzimas, suco gástrico, pH, temperatura), entre outros. Após estes testes, experimentos com suplementação *in vivo* devem ser realizados para conferir se há benefícios com a

suplementação desses novos microorganismos em pequena e grande escala. Por fim, o probiótico que apresentou resultados significativamente satisfatórios pode ser produzido comercialmente.

**Figura 1:** Diagrama para seleção de probióticos. Adaptado de Balcázar et al.(2006).



O uso de probióticos na nutrição humana e animal é amplamente relatado na literatura (FULLER, 1992; MULDER; HAVENAAR; HUIS IN'T VELD, 1997) e aplicado na aquicultura por Gatesoupe (1999), Gomez-Gil; Roque e Turnbull (2000), Verschuere et al. (2000), Irianto e Austin (2002) e Bachère (2003).

Alguns estudos mostram que a suplementação com probióticos no cultivo de organismos aquáticos melhora tanto o desempenho e a saúde dos animais, como também o ambiente de criação (DALMIN; KATHIRESAN; PURUSHOTHAMAN, 2001; NOGAMI; MAEDA, 1992; NOGAMI et al., 1997). Porém, outros estudos não relatam efeitos positivos (MAKRIDIS; FJELLHEIM; SKJERMO, 2000; MEURER et al., 2006).

Por isso, diferentes microorganismos são testados como probióticos para diferentes espécies de animais, fases de desenvolvimento e sistemas de criação. Entre eles destacam-se principalmente as bactérias ácido-láticas, algumas não ácido-láticas, além de leveduras do gênero *Saccharomyces*.

Entretanto, o efeito benéfico no desempenho zootécnico, bem como os mecanismos de ação e a “proteção” imunológica proporcionada pelos probióticos, não estão ainda bem esclarecidos (BALCÁZAR et al., 2006). Desta forma são necessários estudos mais aprofundados para elucidar a

ação destes suplementos. Os resultados positivos da aplicação de probióticos em cultivos podem representar uma excelente ferramenta em substituição aos antibióticos e quimioterápicos, que podem causar problemas econômicos, sanitários e ambientais.

### JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a suplementação de probióticos em aquicultura ainda são escassos e muitas vezes de difícil interpretação, já que os benefícios de sua suplementação nem sempre são evidentes. Isto pode ocorrer devido à complexidade do ambiente no qual os animais são cultivados, já que diversos fatores podem afetar o desempenho dos animais, mascarando a ação dos probióticos.

A influência no desempenho zootécnico dos animais, os mecanismos de ação e a “proteção” imunológica proporcionada pelos probióticos, ainda não estão bem esclarecidos, daí a necessidade de estudos mais aprofundados, que propiciem um maior entendimento sobre a ação destes suplementos na piscicultura. Ainda, os resultados positivos da aplicação de probióticos podem representar uma excelente ferramenta em substituição aos antibióticos e quimioterápicos, que podem causar problemas econômicos, sanitários e ambientais.

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, na utilização dos nutrientes da dieta, na digestibilidade de rações comerciais e na resistência à infecção bacteriana em tilápia do Nilo.

#### *Objetivos Específicos*

Comparar os efeitos da suplementação de dois probióticos, a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e a bactéria (*Lactobacillus plantarum*), em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre as seguintes variáveis:

1. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca, por meio da realização de um ensaio de digestibilidade, que testará os dois suplementos incorporados na ração.
2. Desempenho zootécnico, por meio da determinação do ganho em peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar, utilizando a suplementação da levedura na água e da bactéria na ração.
3. Taxa de retenção protéica e energética, por meio da análise da composição corporal inicial e final dos peixes, bem como a quantidade de proteína e energia consumida.
4. Resistência à infecção por uma bactéria patogênica após desafio, por meio da avaliação da sobrevivência dos peixes após o ensaio alimentar, quando a suplementação com a levedura foi feita na água e, com a bactéria, na ração.

Os capítulos a seguir foram redigidos seguindo as normas das revistas “*Journal of Fish Diseases*” e “*Aquaculture Nutrition*” para o capítulo I e II, respectivamente.

## CAPÍTULO I

### **Avaliação no desempenho zootécnico, resistência à infecção por patógeno e digestibilidade de nutrientes em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após suplementação dietética com a bactéria ácido-lática (*Lactobacillus plantarum*) como probiótico.**

Fernando Henrique Gomes Cornélio, Eduardo Carginin Ferreira<sup>1</sup>, José Luiz Pedreira Mouriño e Débora Machado Fracalossi \*

Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)  
Rodovia Admar Gonzaga, 1346 CEP 88034-001 Florianópolis, SC – Brasil

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFSC

\*Autor para correspondência: deboraf@cca.ufsc.br

#### **Resumo**

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação de um probiótico experimental na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre seu desempenho zootécnico, resistência e a digestibilidade de uma ração comercial. O probiótico testado foi a bactéria ácido - láctica *Lactobacillus plantarum*, isolada do trato intestinal da própria tilápia, o qual foi incorporado à ração na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/g. Ao final do ensaio alimentar, os peixes foram desafiados com o patógeno *Aeromonas hydrophila*, sendo a sobrevivência avaliada durante 96 h. Um segundo ensaio comparou a digestibilidade da ração comercial quando suplementada ou não com o probiótico. Foi utilizado o método indireto na determinação da digestibilidade, com o uso de 0,5% de óxido de cromo como indicador, sendo a coleta de fezes feita por sedimentação, em tanques cilindros-cônicos equipados com tubo coletor. A suplementação com o probiótico melhorou significativamente ( $p < 0,05$ ) o ganho em peso e a conversão alimentar dos peixes, bem como sua resistência à infecção por patógeno. Entretanto, a suplementação não proporcionou uma melhora nos coeficientes de digestibilidade da proteína, energia e matéria seca da ração comercial.

*Palavras chaves:* *Oreochromis niloticus*, *probiótico*, *digestibilidade*, *crescimento*, *Lactobacillus plantarum*, *desafio*

#### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the effect of an experimental probiotic supplementation in the diet of young Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on their zootechnical development, pathogenic resistance and the digestibility of a commercial ration. The probiotic tested was the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*, isolated from the intestinal tract of the own Nile Tilapia species, which was incorporated to the ration with the concentration of  $1 \times 10^8$  UFC/g. By the end of growth rehearsal, the fishes were challenged with the pathogen *Aeromonas hydrophila*, and the survival evaluation has lasted for 96 hours. A second rehearsal compared the digestibility of the commercial ration when supplemented or not with the probiotic. The indirect method was used in the determination of the digestibility, with the use of 0,5% of chrome oxide as indicator, being the collection of feces done by sedimentation, in conical cylinder tanks equipped with tube collector. The supplementation with the probiotic have improved significantly ( $p < 0,05$ ) the gain of weight ( $23,5 \pm 0,19$ ) and the feeding conversion of the fishes ( $1,27 \pm 0,02$ ), as well as its resistance to the infection by the pathogen. However, that the supplementation has not provided an improvement in the coefficients of digestibility of protein, energy and dry matter of the commercial ration.

*Keywords:* *Oreochromis niloticus*, *probiotics*, *digestibility*, *growth*, *Lactobacillus plantarum*, *challenge*

## Introdução

O termo probiótico foi proposto pela primeira vez em 1965, por Lilly & Stillwel, para denominar substâncias secretadas por um determinado protozoário que causavam efeito benéfico a outros microrganismos. Mais recentemente, Schrezenmeir & Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar “preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis, definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde, através de estímulos a esta microbiota”.

Os estímulos à microbiota do hospedeiro causado pelo probiótico podem ser uma ferramenta importante para reduzir ou eliminar a incidência de microrganismos patógenos num sistema de produção. O probiótico pode ser fornecido por meio da ração, na suplementação do alimento vivo para larvas ou diretamente na água. A forma de ação dos probióticos não está completamente elucidada, mas há estudos que sugerem que possa ser pela competição por sítios de ligação na parede intestinal, pela produção de inibidores ou pela competição por nutrientes e energia (Patra & Mohamed 2003), além de estímulo ao sistema imunológico (Heyman & Ménard 2002).

Com a intensificação dos modelos de sistemas de cultivo, os peixes ficam mais sujeitos às respostas do estresse causado pela restrição de espaço, piora da qualidade de água, aumento no manejo e outros fatores que podem debilitar o seu sistema imune. Com isso, a infecção por microrganismos patógenos oportunistas é facilitada, levando ao aparecimento de enfermidades que podem prejudicar o crescimento ou até causar mortalidade. Para evitar perdas, tanto em mortalidade quanto em desempenho, antibióticos ou outros quimioterápicos são utilizados, com o intuito de inibir ou reduzir a proliferação de patógenos, diminuindo o risco de infecção (Correa, Gomes, Corrêa, Salles & Curvello 2002; Nayak, Swain & Mukherjee 2007). No entanto, nem sempre há fiscalização adequada para o uso dessas substâncias na aquicultura, o que resulta no mau uso dos produtos, sem que haja prescrição de dosagem, respeito aos períodos de tratamento e períodos de carência (Hisano, Ishikawa, Ferreira, Bulgarelli, Costa & Pádua 2006). Com isso, vários estudos são desenvolvidos para oferecer alternativas ao uso de antibióticos e quimioterápicos, visto que seu uso já é proibido em vários países (Best 1999). Dentre as alternativas, surge a utilização de probióticos, os quais objetivam estabilizar e manter uma determinada população bacteriana em condições normais (Owings, Reynoldas, Hasiak & Ferket 1990; Jones 1991), favorecendo seu desempenho zootécnico e imunocompetência frente aos desafios presentes no ambiente de cultivo.

Vários microrganismos são testados como probióticos, destacando-se entre eles as bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido-láticas e as leveduras do gênero *Saccharomyces*. No presente estudo, foi testado um probiótico experimental: a bactéria ácido-láctica *Lactobacillus plantarum*, isolada do sistema digestório de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e anteriormente identificada como potencial probiótico por Jatobá, Vieira, Buglione Neto, Silva, Mouriño, Jerônimo, Dotta & Martins (2008). A suplementação deste isolado na dieta ( $10^8$  UFC g<sup>-1</sup>) de tilápias (peso inicial médio  $182,3 \pm 44,5$  g) por 14 dias promoveu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de eritrócitos, neutrófilos, monócitos, leucócitos e trombócitos, após desafio com o patógeno

*Enterococcus durans*, por injeção intraperitoneal e inibiu o crescimento *in vitro* dos patógenos *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *E. durans*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli* (Jatobá *et al.*, 2008). Entretanto, o efeito desta suplementação no desempenho e na utilização dos nutrientes pela tilápia ainda não foi avaliado.

Portanto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de uma ração comercial com um probiótico experimental, a bactéria ácido-lática *Lactobacillus plantarum*, sobre o desempenho zootécnico e a resistência à infecção por patógeno em tilápia do Nilo, bem como sobre a digestibilidade da matéria seca, proteína e energia de uma ração comercial.

### **Materiais e Métodos**

Inicialmente foi realizado um ensaio de crescimento, com duração de 55 dias, onde três grupos de alevinos da espécie tilapia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) foram alimentados com uma ração comercial suplementada com o probiótico, enquanto outros três grupos, somente com a ração comercial, sem suplementação. Ao final dos 55 dias, os peixes foram desafiados com o patógeno *Aeromonas hydrophila*, sendo a sobrevivência avaliada durante 96 h.

Um segundo ensaio comparou a digestibilidade da ração comercial quando suplementada ou não com o probiótico, em seis grupos de peixes, os quais foram distribuídos em seis tanques cilíndrico-cônicos com volume de 200 L. Da mesma forma que no ensaio de crescimento, três grupos receberam uma ração comercial (36% de proteína bruta) suplementada com a bactéria, enquanto os outros três, a ração comercial sem suplementação.

Os exemplares de tilápia para os dois ensaios foram adquiridos de uma fazenda comercial. Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental completamente casualizado e os tanques mantidos em sistemas fechados de recirculação de água, com troca parcial de 10-15 L min<sup>-1</sup>, equipados com aeração e controle de temperatura. A qualidade da água foi aferida pela determinação diária do oxigênio dissolvido e temperatura com oxímetro (YSI), bem como pela medida semanal do pH e concentração de amônia total, através de kits específicos.

#### **Suplementação da ração comercial com probiótico e alimentação dos peixes**

No ensaio de crescimento utilizou-se uma ração comercial com 40% de proteína bruta, enquanto que no ensaio de digestibilidade, uma com 36%. Para ambos os ensaios as rações foram suplementadas com o probiótico experimental.

O probiótico utilizado foi a bactéria ácido-lática *Lactobacillus plantarum* CPQBA 227-08 DRM, isolada do trato digestório de tilápia do Nilo, a qual foi identificada bioquimicamente através da utilização do kit api50 CH. Essas cepas foram aspergidas na ração depois de crescidas em meio de cultura "Man Rogosa e Sharpe" (MRS), na concentração de 1x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, na proporção de 100 mL kg<sup>-1</sup> da ração comercial. Essa mistura foi incubada durante 24 h, a 35°C, em recipiente hermeticamente fechado. A ração que não recebeu a suplementação com probiótico foi submetida ao mesmo procedimento, mas a aspersão foi feita somente com água. Após o período de incubação, as rações foram secas a mesma temperatura, por 24 h. A quantificação das bactérias na ração foi

realizada utilizando-se o mesmo procedimento descrito por Jatobá *et al.* (2008), onde diluições de  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  foram aspergidas em meio de cultura agar para a contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônias)  $g^{-1}$  de ração.

No ensaio de crescimento, os peixes foram alimentados inicialmente com quantidade de ração equivalente a 7% da biomassa/tanque/dia, a qual foi reduzida para 5% no final do ensaio (Kubitza 2000). Esta quantidade de ração foi fornecida três vezes ao dia (8 h, 13 h e 18 h).

No ensaio de digestibilidade, os peixes foram alimentados três vezes ao dia, às 8 h, 12 h e 16 h, com uma quantidade diária de ração equivalente a 3% do peso vivo de cada tanque (Kubitza 2000).

### **Ensaio de crescimento**

Nesse primeiro ensaio foram utilizados 180 alevinos de tilápias, com peso inicial de  $2,4 g \pm 0,5$ . Os peixes foram aclimatados às condições experimentais por uma semana em seis tanques com volume útil de 120 L, na densidade de 30 peixes/tanque. Três tanques receberam a ração suplementada com probiótico e outros três, somente a ração comercial, como controle.

Dois grupos de 20 peixes, com a mesma média de peso daqueles estocados, foram amostrados para a análise da composição corporal inicial. Os peixes dentro de cada grupo foram triturados e homogeneizados para compor as amostras iniciais. O mesmo procedimento foi adotado para a análise da composição final dos peixes, mas, neste caso, dois peixes foram coletados de cada unidade experimental, os quais foram homogeneizados para compor a amostra analisada.

Foram realizadas biometrias em intervalos de aproximadamente 10 dias para avaliação do crescimento e ajuste da quantidade de ração.

### **Desafio com bactéria patogênica**

Ao final do ensaio alimentar, os peixes foram submetidos a um desafio com a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila hydrophila* CPQBA 228-08 DRM, gentilmente cedida pelo setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos, UFSC, para avaliação da resistência à infecção. Os peixes de cada unidade experimental foram subdivididos em dois grupos de igual número: o primeiro grupo recebeu 0,4 mL de uma solução contendo o patógeno *Aeromonas hydrophila* ( $10^7$  células  $mL^{-1}$ ) por injeção intraperitoneal e, o segundo grupo, foi o controle da infecção, recebendo 0,4 ml de uma solução salina. Estes peixes foram mantidos fora do sistema de recirculação de água e ficaram sob observação durante 96 h, quando foram registrados os sinais clínicos e a mortalidade.

### **Ensaio de digestibilidade**

Neste ensaio foram utilizados 48 juvenis de tilápias, com peso de  $230 g \pm 10 g$ . Os peixes foram aclimatados às condições experimentais por uma semana em seis tanques cilíndrico-cônicos com volume de 200 L, na densidade de 8 peixes/tanque.

Foi avaliada a digestibilidade da proteína, energia e matéria seca de uma ração comercial, suplementada com o mesmo probiótico. Três tanques receberam a ração suplementada com probiótico e outros três, somente a ração comercial, como controle. O método indireto foi empregado na determinação da digestibilidade, com o uso de 0,5% de óxido de cromo como indicador. As fezes foram coletadas por sedimentação em tubo coletor (50 mL) situado no fundo de cada tanque cilindro-

cônico, duas vezes ao dia, em intervalos de 6 h, às 24 h e 6 h. Durante os intervalos entre coletas, os tubos coletores ficavam imersos em recipiente com gelo, para evitar ação bacteriana.

O método de coleta de fezes foi o mesmo descrito por Oliveira Filho & Fracalossi (2006), apenas com uma modificação: os animais não foram transferidos dos tanques de alimentação para os tanques de coleta de fezes. Portanto, o período de coleta de fezes foi precedido de uma limpeza rigorosa das paredes internas do tanque, bem como de 90% de troca de água, para evitar contaminação das fezes com restos de ração e/ou com filme bacteriano formado nas paredes do tanque. Os tubos coletores contendo as fezes foram centrifugados a 2, 296 x g por 5 min. O líquido sobrenadante foi descartado e as fezes, secas em estufa (50 °C) durante 24 h. Após secagem, as fezes foram trituradas e congeladas a -20 °C para análises posteriores.

A concentração de óxido de crômio (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), proteína bruta, energia bruta e matéria seca foram determinadas na ração e nas fezes para estimar os coeficientes de digestibilidade aparente da ração comercial com e sem a suplementação dos probióticos.

### ***Análise histológica dos intestinos***

Foram coletadas amostras do intestino anterior, médio e posterior de dois peixes por unidade experimental, tanto no ensaio de crescimento quanto no ensaio de digestibilidade, para confirmação da colonização pela bactéria, quando adicionada na ração, bem como para detectar possíveis alterações morfológicas ocasionadas pela adição do probiótico.

As amostras foram fixadas em formol tamponado com fosfato 0,1 M a pH 7,2 durante um mínimo de 48 h. Posteriormente, foram lavadas em água corrente durante 2 h. Depois de uma cuidadosa desidratação em etanol, utilizou-se a metodologia de rotina, tal como descrita por Cargnin-Ferreira & Sarasquete (2008), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol. Depois da inclusão em parafina, os blocos foram cortados em micrótomo Leica RM 2025 na espessura de 5 µm. Os cortes foram estirados e recolhidos em banho termostático a 52°C e finalmente aderidos a lâminas gelatinizadas.

Os cortes obtidos foram desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados com a técnica de Cason (Cargnin-Ferreira & Sarasquete 2008). Esta técnica, por ser tricrômica, evidencia sobremaneira compostos protéicos e glicídicos, assim como estruturas morfológicas similares com cores distintas, aumentando os contrastes e propiciando uma melhor visualização das estruturas analisadas.

### ***Análises proximais da ração, fezes e composição corporal dos peixes***

A composição proximal das rações comerciais utilizadas no ensaio de crescimento e no ensaio de digestibilidade foi realizada conforme procedimentos descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999) e está apresentada na Tabela 1. A umidade foi determinada por secagem a 105°C em estufa até peso constante; as cinzas, por queima a 550°C em forno mufla; a proteína bruta, por digestão ácida (N x 6,25, método de Kjeldahl); o extrato etéreo, pelo método de Soxhlet, após digestão ácida; a fibra em detergente ácido e a energia bruta em bomba calorimétrica.

No ensaio de digestibilidade, também foi analisada a concentração de óxido de crômio nas rações e nas fezes, utilizando-se a metodologia descrita por Bremer Neto, Graner, Pezzato, Padovani

& Cantelmo (2003). As fezes foram analisadas para determinar sua concentração em energia bruta, proteína bruta e matéria seca, conforme descrito para análise das rações comerciais.

**Tabela 1.** Média da composição proximal das rações comerciais para tilápia utilizadas no ensaio de crescimento e no ensaio de digestibilidade.

Fração	Crescimento	Digestibilidade
	%	
Umidade	7,00	9,46
Proteína bruta	41,60	40,50
Cinzas	10,31	10,27
Extrato etéreo	7,50	7,49
Fibra em detergente ácido	5,08	5,86
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4.128	4.021

No ensaio de crescimento, foram determinados o ganho em peso e a conversão alimentar, segundo as equações:

$$\text{Ganho em peso (g)} = GP = (Pf - Pi)$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (\%)} = TCE = 100 \times (\ln Pf - \ln Pi) / t$$

$$\text{Conversão alimentar} = CA = Qro / GP$$

Onde: Pf = peso médio (g) no final do experimento

Pi = peso médio (g) no início do experimento

Qro = quantidade de ração ofertada

A análise da composição corporal inicial e final dos peixes no ensaio de crescimento incluiu a determinação da proteína bruta, energia bruta e matéria seca, conforme descrito para as rações, para cálculo da taxa de retenção da proteína e energia da dieta, segundo as equações:

$$\text{Taxa de retenção protéica (\%)}: TRP = \frac{[\text{peso corporal final (g)} \times \text{proteína corporal final (\%)}] - [\text{peso corporal inicial (g)} \times \text{proteína corporal inicial (\%)}]}{\text{proteína consumida (g)} \times 100}$$

$$\text{Taxa de retenção de energia (\%)}: TRE = \frac{[\text{peso corporal final (g)} \times \text{energia corporal final (\%)}] - [\text{peso corporal inicial (g)} \times \text{energia corporal inicial (\%)}]}{\text{energia consumida (kcal)} \times 100}$$

No ensaio de digestibilidade, o coeficiente de digestibilidade aparente das rações foi calculado segundo as seguintes equações:

Para matéria seca (Belal 2005):

$$CDA\% = 100 - \frac{100 \times \% \text{indicador na ração}}{\% \text{indicador nas fezes}}$$

Para proteína e energia (Nose 1960):

$$CDA\% = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{\% \text{marcador na dieta}}{\% \text{marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{nutriente nas fezes}}{\% \text{nutriente na dieta}} \right) \right]$$

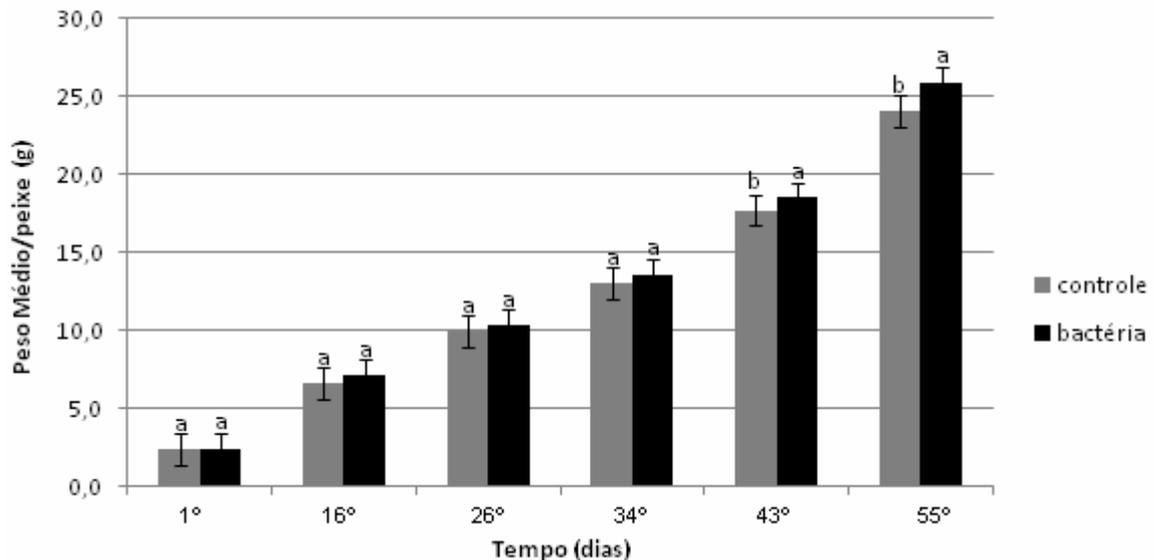
### Análise estatística

Todos os dados obtidos nos ensaios de crescimento, desafio e digestibilidade foram submetidos ao teste t, para avaliar o efeito da suplementação com o probiótico. O nível de significância adotado foi de 5%.

### Resultados e Discussão

Os valores médios observados para qualidade de água no ensaio de crescimento foram: temperatura ( $28 \pm 0,5$  °C), pH ( $6,5 \pm 0,3$ ); oxigênio dissolvido ( $6,0 \pm 0,7$  mg L<sup>-1</sup>) e amônia total (<0,25 mg L<sup>-1</sup>). E no ensaio da digestibilidade foram ( $27 \pm 0,7$  °C); pH ( $6,80 \pm 0,2$ ); oxigênio dissolvido ( $6,0 \pm 0,4$  mg L<sup>-1</sup>) e amônia total (<0,25 mg L<sup>-1</sup>). Tanto no primeiro ensaio quanto no segundo os valores mostraram-se adequados para o cultivo de tilápia, conforme descrito por Balarin & Hatton (1979) e Popma & Lovshin (1994).

Não houve mortalidade nos ensaios de crescimento e digestibilidade. A Figura 1 apresenta a evolução do peso médio dos peixes quando alimentados com ração suplementada com probiótico em relação ao controle, ao longo do período experimental, no ensaio de crescimento.



**Figura 1.** Evolução do peso médio de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com ração suplementada (bactéria) ou não (controle) com probiótico (*Lactobacillus plantarum*), ao longo do período experimental. Peso inicial médio  $\pm$  desvio padrão ( $2,4 \pm 0,5$ ). Barras com letras diferentes, dentro do mesmo período, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 2 sumariza as variáveis de desempenho e utilização dos nutrientes da dieta. O ganho em peso e a conversão alimentar foram afetados significativamente ( $p < 0,05$ ) pela ração suplementada com o probiótico, quando comparados com o tratamento controle. Igualmente, houve maior retenção de proteína e energia nos peixes que receberam suplementação. Já a taxa de crescimento específico não foi afetada pela suplementação.

**Tabela 2.** Valores médios de ganho em peso, conversão alimentar, taxas de crescimento específico, retenção protéica e energética de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações suplementadas ou não com probiótico (*Lactobacillus plantarum*) por 55 dias.

Variáveis	Ração suplementada <sup>1</sup>	Ração Controle
Ganho em peso, g	23,5 ± 0,19 <sup>a</sup>	21,7 ± 0,8 <sup>b</sup>
Conversão alimentar	1,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,03 <sup>b</sup>
Taxa de crescimento específico, %	4,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,25 ± 0,10 <sup>a</sup>
Taxa de retenção protéica, %	29,87 ± 1,28 <sup>a</sup>	27,15 ± 0,9 <sup>b</sup>
Taxa de retenção energética, %	24,8 ± 0,42 <sup>a</sup>	22,5 ± 0,42 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Ver texto para detalhamento.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

A suplementação com a dieta contendo o probiótico não afetou significativamente a composição corporal dos peixes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios da composição corporal de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações suplementadas ou não com probiótico (*Lactobacillus plantarum*), após 55 dias (dados expressos na matéria úmida).

Composição corporal %	Controle	Ração suplementada <sup>1</sup>
Umidade	74,13 <sup>a</sup>	74,65 <sup>a</sup>
Proteína bruta	15,06 <sup>a</sup>	15,62 <sup>a</sup>
Extrato etéreo	3,92 <sup>a</sup>	4,65 <sup>a</sup>
Matéria mineral	5,29 <sup>a</sup>	5,02 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Ver texto para detalhamento.

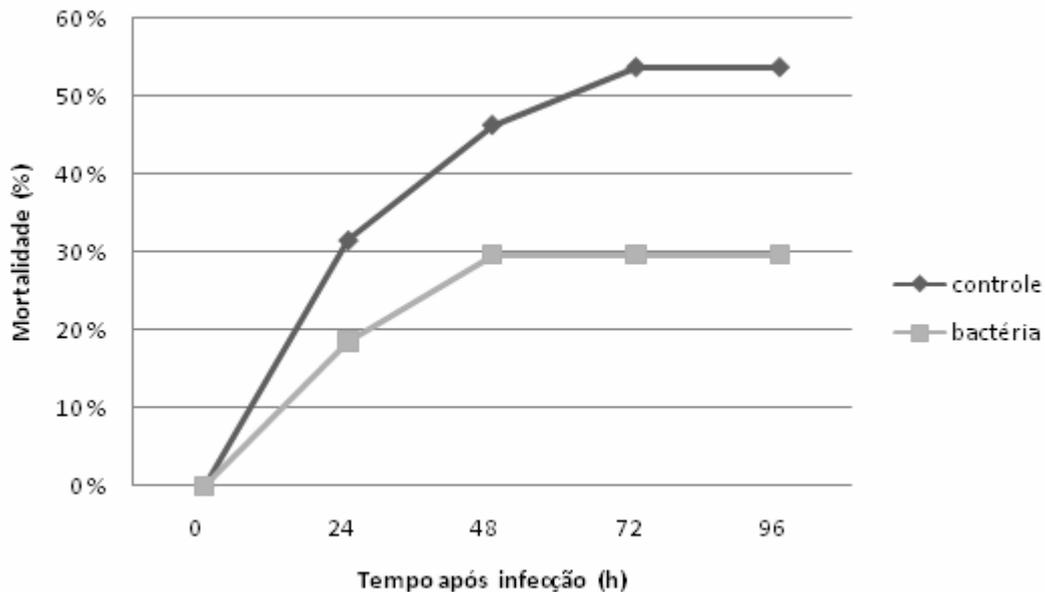
<sup>a,b</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

Já no ensaio de resistência houve uma diminuição significativa na mortalidade, de 56% para 30%, nos peixes alimentados com a dieta suplementada com probiótico ( $p < 0,05$ ), após o desafio com o patógeno. A diferença na mortalidade foi significativa desde 24 h após a infecção (Figura 2). Não houve mortalidade nos grupos de peixe que foram injetados com a solução salina.

No presente estudo, a suplementação da ração com a bactéria *Lactobacillus plantarum* promoveu uma melhora significativa no ganho em peso, conversão alimentar e taxas de retenção protéica e energética. Estes resultados concordam com estudos recentes, onde bactérias foram suplementadas na ração (Aly, Ahmed, Ghareeb & Moahmed 2008b) ou na água de cultivo de tilápia do Nilo (Wang, Tian, Yao & Li 2008). No estudo relatado por Aly e colaboradores (2008b) foram utilizados peixes com peso inicial maior ( $5,0 \pm 0,9$  g) que os do presente estudo e as bactérias testadas foram: *L. acidophilus* ( $10^7$  g<sup>-1</sup> ração), *B. subtilis* ( $10^7$  g<sup>-1</sup>) e uma mistura de *L. acidophilus* e *B. subtilis* ( $0,5 \times 10^7$

de cada bactéria g<sup>-1</sup> ração). Foi observado um aumento significativo no ganho em peso e conversão alimentar nos grupos de peixes alimentados por 8 semanas com as rações suplementadas, quando comparados com o grupo alimentado com ração sem suplementação.

No presente estudo, a suplementação da ração com a bactéria *Lactobacillus plantarum* também proporcionou um aumento na resistência à infecção pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*.

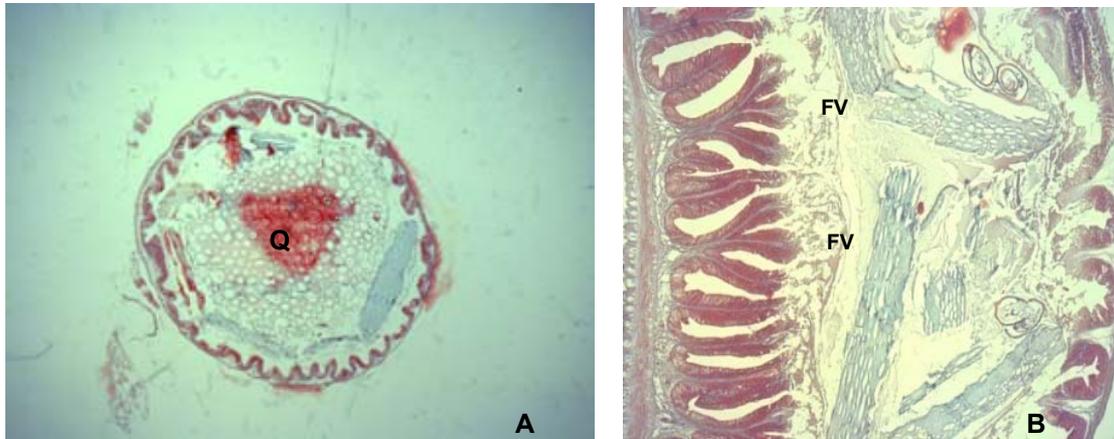


**Figura 2.** Mortalidade de tilápia do Nilo alimentada com ração suplementada (bactéria) ou não (controle) com probiótico (*Lactobacillus plantarum*), após desafio com o patógeno *Aeromonas hydrophila*, durante 96 h.

Resposta similar foi relatada por Aly, Abd-el-Rahman, John & Mohamed (2008a), onde um aumento significativo na resistência à infecção pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*, após desafio ( $10^8$  mL<sup>-1</sup>, injeção intraperitoneal), foi significativamente maior em tilápias (peso inicial 9 g) alimentadas por 14 dias com ração suplementada com *Bacillus firmus*, *B. pumilus*, *Citrobacter freundii*, e uma mistura destas três bactérias, na concentração de  $10^7$  g<sup>-1</sup> ração, quando comparada com a sobrevivência dos peixes alimentados com ração não suplementada com probióticos. Um aumento significativo na resistência de tilapia-do-nilo à infecção por *Edwardsiella tarda* também foi relatado por Pirarat, Kobayashi, Katagiri, Maita & Endo (2006) após suplementação da dieta com a bactéria *Lactobacillus rhamnosus*.

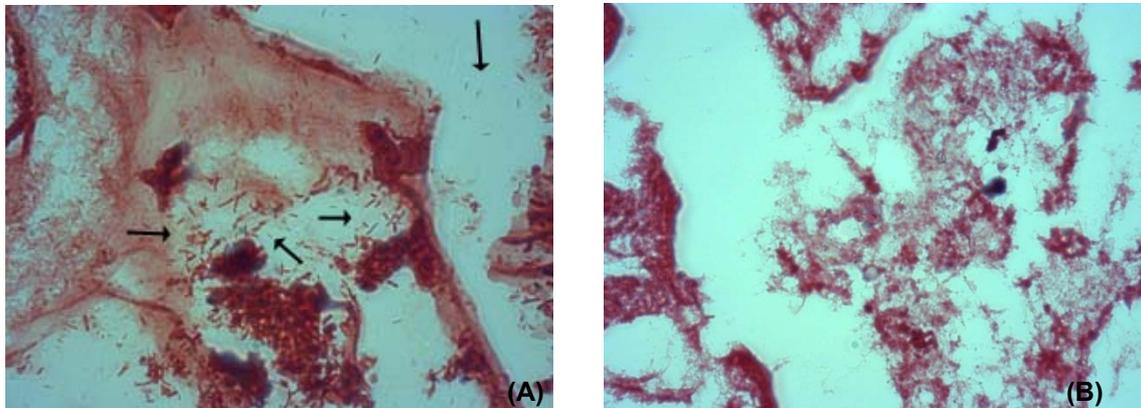
Um provável mecanismo de ação das bactérias probióticas no aumento da resistência à infecção por patógenos foi descrito por Balcázar, Vendrell, Blas, Ruiz-Zarzuela, Muzquiz & Girones (2008), onde a habilidade de três bactérias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* CLFP 101, *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, e *Lactobacillus fermentum* CLFP 242) em inibir a adesão *in vitro* de patógenos de peixes (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* e *Vibrio anguillarum*) foi testada no muco da pele e dos intestinos de truta arco-íris (*O. mykiss*). As bactérias probióticas demonstraram uma alta capacidade de aderir ao muco intestinal, causando uma diminuição significativa na adesão dos patógenos, provavelmente pela secreção de substâncias antimicrobianas e pela exclusão competitiva.

Não foi observada qualquer alteração morfológica significativa no intestino dos animais com a suplementação do probiótico em ambos os ensaios (Figura 3).



**Figura 3.** Fotomicrografias típicas do intestino anterior de tilápia do Nilo alimentada com ração suplementada ou não com o probiótico (*Lactobacillus plantarum*), em dois aumentos 40X (esquerda) e 100X (direita). A fotografia da direita mostra fibras vegetais (FV) no quimo (Q). Não houve alteração significativa da morfologia intestinal com a suplementação do probiótico na ração.

A análise das imagens comprovou um aumento na população bacteriana nos intestinos dos peixes alimentados com a ração suplementada com probiótico, tanto no ensaio de crescimento como no ensaio de digestibilidade (Figura 4).



**Figura 4.** Fotomicrografias típicas da luz do intestino (1000X) de tilápia alimentada com ração suplementada com probiótico (A), onde se observam grupos de filamentos celulares da bactéria *Lactobacillus plantarum* (setas). Estes não foram detectados em peixes que não receberam a suplementação (B).

As médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia da ração comercial suplementada ou não com o probiótico, encontram-se na Tabela 4. No presente estudo, apesar do significativo aumento no ganho em peso e conversão alimentar, não houve melhora na digestibilidade da energia, proteína e matéria seca da ração com a suplementação com a bactéria *Lactobacillus plantarum* ( $p>0,05$ ). Poucos são os estudos que avaliaram a digestibilidade dos nutrientes de uma dieta após a suplementação com probióticos (Lara-Flores *et al.* 2003; De Schrijver & Ollevier 2000). A digestibilidade da matéria orgânica e da proteína aumentou ( $p<0,05$ ).

após a suplementação de um probiótico comercial, composto pelas bactérias *Streptococcus faescium* e *Lactobacillus acidophilus*, na dieta de tilápia do Nilo (152,3 g peso médio inicial) na maior densidade testada, mas diminuiu para proteína e não se alterou para a matéria orgânica, quando uma menor densidade de peixes foi adotada (Lara-Flores *et al.* 2003). A digestibilidade da proteína foi significativamente maior, mas a um nível de significância de 1%, no reto e porção distal do intestino de juvenis de turbot (*Schophtalmus maximus*, 25 a 30 g) alimentados diretamente no estômago, via cânula, com uma dieta líquida, suplementada ( $10^{10}$ ) com *Vibrio proteolyticus* (De Schrijver & Ollevier 2000). Desta forma, o aumento da digestibilidade dos nutrientes da dieta não parece ser um efeito constante da suplementação de bactérias probióticas à dieta e não explicar, portanto, o efeito benéfico no crescimento observado no presente estudo. Houve um aumento no ganho em peso, conversão alimentar e taxas de retenção protéica e energética com a suplementação, mas a digestibilidade da ração não foi afetada. Provavelmente o efeito positivo no crescimento com a suplementação do probiótico está relacionado a um menor gasto protéico e energético com os mecanismos de defesa e, portanto, uma maior eficiência na utilização da energia e proteína da dieta para crescimento. Já que tanto o presente estudo como vários estudos aqui discutidos comprovam um aumento na resistência à infecção por patógenos (Aly *et al.* 2008b; Pirarat *et al.* 2006) e/ou nas respostas imunes em animais alimentados com dieta suplementada com probióticos (Jatobá *et al.* 2008, Wang *et al.* 2008).

**Tabela 4.** Médias dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, matéria seca e energia de uma ração comercial com ou sem a suplementação de probiótico (*Lactobacillus plantarum*), para a tilápia do Nilo.

Fração	Ração Comercial	Ração Comercial Suplementada com a Bactéria
	%	
Matéria Seca	70,5 ± 1,10 <sup>a</sup>	72,8 ± 0,70 <sup>a</sup>
Proteína	83,5 ± 0,67 <sup>a</sup>	84,8 ± 0,45 <sup>a</sup>
Energia	77,0 ± 2,20 <sup>a</sup>	78,6 ± 0,1 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias na linha seguidas das mesmas letras não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

### Referências Bibliográficas

- Aly S.M., Abd-el-Rahman A.M., John G. & Mohamed, M.F., (2008a). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, **277**, 1–6.
- Aly, S.M., Ahmed Y.A., Ghareeb A.A. & Moahmed M.F., (2008b). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**, 128-136.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, (1999). *Official Methods of Analysis*. 16.ed. Washington, D.C., 1141p.
- Balarin J.D., Hatton J.P., (1979). *Tilapia: A Guide to their Biology and Culture in Africa*, Pisces Press, University of Stirling, Scotland, 147p.
- Balcázar J.L., Vendrell D., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Muzquiz J.L. & Olivia Girones., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish, *Aquaculture*, **278**, 188-191.
- Belal I.E.H., (2005). A review of some fish nutrition methodologies. *Biosource Technology*, **96**, 395-402.
- Bremer Neto H., Graner C.A.F., Pezzato L.E., Padovani C.R. & Cantelmo O.A. (2003). Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **32**, 249-255.
- Cargnin-Ferreira E. & Sarasquete C. (2008). *Histofisiologia de Moluscos Bivalvos Marinos*. Ed. CSIC, Madrid, 94p.
- Correa G.S.S., Gomes A.V.C., Corrêa A.B., Salles A.S. & Fernando Augusto Curvello (2002). Digestibilidade da ração de frangos de corte suplementados com probióticos e antibiótico. *Ciência Rural*, Santa Maria, **32**, 687-691.
- De Schrijver R., Ollevier F., (2000). Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, **186**, 107– 116.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 17 de maio de 2008.
- Heyman M., Ménard S., (2002). Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 1151-1165.
- Hisano H., Ishikawa M.M, Ferreira R.A, Bulgarelli A.L.A, Costa T.R. & Pádua S.B., (2006). Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Scientiarum – Biological Sciences*, Maringá, **28**, 311-318.
- Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, (2007). *Estatísticas da pesca 2005 – Brasil*, Grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 147p.
- Jatobá A., Vieira F.N., Buglione Neto 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*, Brasília, **43**, p.2.
- Jones F.T., (1991). Use of direct-fed microbials not new: way work still not clean. *Feedstuffs*, **63**, 17-19.
- Kubitza F., (2000). *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: F. Kubitza. 289p.
- Kubitza F., (2007). A produção de pescado no mundo e a aqüicultura. *Revista Panorama da Aqüicultura*. Rio de Janeiro, 17p.
- Lara-Flores M., Olvera-Novoa M.A., Guzmán-Méndez B.E. & López-Madrid W., (2003). Use of bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **216**, 193-201.
- Lilly, D.M. & Stillwell, R.H., (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, Washington, 147, 747-748.
- Nayak S.K., Swain P. & Mukherjee S.C., (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology*, **23**, 892-896.
- Nose, T., (1960). On the digestion of food protein by goldfish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). *Bulletin Freshwater Fisheries Research Laboratory*, Tokyo, **10**, 11-22.
- Oliveira Filho P.R.C. & Fracalossi D.M., (2006). Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, **35**, 1581-1587.
- Owings W.J., Reynoldas D.L., Hasiak R.J. & Ferket P.R., (1990). Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. *Poultry Science*, **69**, 1257-1264.
- Patra S.K. & Mohamed K.S., (2003). Enrichment of Artemia nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International*, **11**, 505-514.
- 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.
- Popma T.J. & Lovshin L., (1994). *Worldwide prospects for commercial production of tilapia*. Auburn-Alabama: International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, 40p.
- Schrezenmeir, J. & De Vrese, M., (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, **73**, 361-364.
- Wang Y.B., Tian Z.Q., Yao J.T. & Li W. (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, **277**, 203-207.
- Zimmermann S., (2000). O bom desempenho das chitraladas no Brasil. *Panorama da Aqüicultura*, **10**, 15-19.

## CAPÍTULO II

### **Condicionamento da água com probiótico a base de *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho e resistência à infecção por patógeno para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e sua suplementação na ração para avaliação da digestibilidade de nutrientes.**

Fernando Henrique Gomes Cornélio, Eduardo Carginin Ferreira<sup>1</sup> e Débora Machado Fracalossi\*

Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Rodovia Admar Gonzaga, 1346 88034-001 Florianópolis, SC

\* Autor para correspondência.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, Embriologia and Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFSC

#### **Resumo**

O objetivo desse estudo foi avaliar um probiótico comercial, constituído por cepas da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) no crescimento, resistência à infecção por patógeno e digestibilidade de uma ração comercial para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). No ensaio de crescimento, três grupos de alevinos, com peso médio de  $2,4 \pm 1,0$  g, receberam suplementação do probiótico semanalmente na água ( $5,6 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup>), enquanto três grupos foram mantidos como controle, sem suplementação. Os peixes mantidos na água condicionada com o probiótico apresentaram maior ganho em peso e melhor conversão alimentar em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Ao final do ensaio alimentar, os peixes foram desafiados intraperitonealmente com o patógeno *Aeromonas hydrophila* na concentração de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup> e a sobrevivência foi avaliada após 96 h. O condicionamento da água com o probiótico aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a resistência dos peixes à infecção. No ensaio de digestibilidade, foi testada a suplementação do mesmo probiótico em ração comercial (40,5% de proteína bruta) para tilápia do Nilo. Três grupos receberam a dieta suplementada com o probiótico ( $4,0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>) e três grupos receberam somente a dieta comercial, sem suplementação. Houve um aumento significativo na digestibilidade da proteína, matéria seca e energia da ração comercial ( $p < 0,05$ ) suplementada com a levedura.

**Palavras chaves:** *Oreochromis niloticus*, probiótico, digestibilidade, crescimento, *Saccharomyces cerevisiae*, desafio

#### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate a commercial probiotic based on the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, resistance to the infection by a pathogen and nutrient digestibility of a commercial diet to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In the growth trial, three groups of 30 fingerling, average weight  $2.4 \text{ g} \pm 1.0 \text{ g}$ , received weekly supplementation of the probiotic in the water (3 mL of the activated product,  $5.6 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), while three groups were maintained in pure water as a control. Fish kept in the water conditioned with the probiotic presented higher weight gain and better feeding conversion when compared to the control ( $p < 0.05$ ). After 55 days, fish were challenged with the pathogen *Aeromonas hydrophila* at the concentration of  $10^7$  cells mL<sup>-1</sup> and the survival was evaluated after 96 h. Conditioning the water with the probiotic increased significantly ( $p < 0,05$ ) fish resistance to infection. In the digestibility trial, the supplementation of the same probiotic was tested in a commercial diet (40.5% crude protein) fo Nile tilapia. Three groups received the diet supplemented with the probiotic ( $4.0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>) and three groups received only the commercial diet, without supplementation. There was a significant increase in the digestibility of protein, dry matter and energy of the commercial diet ( $p < 0.05$ ) supplemented with the probiotic.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*, probiotics, digestibility, growth, *Saccharomyces cerevisiae*, challenge

## Introdução

Com a intensificação dos sistemas de cultivo e consequente aumento da exposição a agentes estressores, há um aumento na susceptibilidade dos peixes a patógenos oportunistas. A microbiota no trato gastrointestinal apresenta importante papel na digestão dos alimentos e pode haver variações na digestibilidade de nutrientes em função dos tipos de microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal (Correa *et al.* 2002). Adicionalmente, diversos fatores, tais como regime alimentar, qualidade de água ou o próprio manejo, podem determinar mudanças na composição da microbiota intestinal. Estas mudanças podem induzir à proliferação de bactérias patogênicas oportunistas, provocando infecção e enfermidades (Verschuere *et al.* 2000; Winton 2001). A *Aeromonas hydrophila* é um exemplo de uma série de bactérias oportunistas, que são freqüentemente isoladas de surtos de mortalidades em massa no cultivo de tilápia (Plumb 1999).

A inclusão de probióticos na produção animal objetiva estabilizar uma determinada população bacteriana a condições ideais de normalidade (Owings *et al.* 1990; Jones 1991) e favorecer o desempenho zootécnico dos animais, bem como sua capacidade de atenuar os desafios presentes no ambiente de criação. Vários estudos relatam o efeito positivo do uso de probióticos na avicultura (Correa *et al.* 2002; Suida 1994), suinocultura (Jorgensen 1989; Korniewicz 1992) e, mais recentemente, na piscicultura (De Schrijver & Ollevier 2000; Suzer *et al.* 2008) e carcinicultura (Garriques & Arevalo 1995; Moriarty 1997). A forma de ação dos probióticos não está completamente elucidada, mas há evidências que seja por competição por sítios de ligação na parede intestinal, produção de substâncias antibacterianas e competição por nutrientes e energia (Balcázar *et al.* 2006), além do estímulo ao sistema imunológico (Heyman & Ménard 2002). A aplicação de probióticos pode representar uma excelente alternativa ao uso de antibióticos e quimioterápicos, os quais podem causar problemas econômicos, sanitários e ambientais.

O uso da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como suplemento probiótico na dieta de organismos aquáticos tem demonstrado um efeito bastante satisfatório, melhorando o crescimento e utilização dos nutrientes (Hisano *et al.* 2007; Swain *et al.* 1996) e a resistência a patógenos (Ortuño *et al.* 2002), bem como aumentando a atividade de enzimas digestivas (Tovar *et al.* 2002), com consequente melhora no aproveitamento da ração pelo hospedeiro. Entretanto, os estudos que avaliam esta suplementação na água, são escassos. Efeitos benéficos desta levedura também são relatados para a tilápia (Lara-Flores *et al.* 2003; Castro & Cervon 2004; Mohsen *et al.* 2008). No entanto, nestes estudos a suplementação é somente realizada na ração, o que não é prático para aplicação a campo, devido à grande quantidade de ração utilizada. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar uma forma mais simples de aplicação da levedura, ou seja, diretamente na água. Foi avaliado se a suplementação na água de um probiótico comercial, constituído por cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, afeta o desempenho e resistência à infecção por patógeno para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), importante espécie para a piscicultura continental mundial (Fitzsimmons 2000). Posteriormente, foi avaliada a digestibilidade da dieta suplementada com o mesmo probiótico, para a mesma espécie.

## Materiais e Métodos

Foram realizados três ensaios: crescimento, desafio com patógeno e digestibilidade, os quais foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis, Santa Catarina.

### **Ensaio de crescimento**

Este ensaio teve por objetivo avaliar o crescimento, conversão alimentar e retenção da proteína e energia da dieta por alevinos de tilápia do Nilo com e sem a suplementação de um probiótico comercial, constituído por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, na água. Foram utilizados 180 alevinos da espécie *Oreochromis niloticus*, com peso inicial de  $2,4 \pm 0,5$  g (média  $\pm$  desvio padrão), provenientes de uma fazenda comercial. Os peixes foram estocados em seis tanques com volume de 120 L, na densidade de 30 peixes/tanque, e aclimatados às condições experimentais por uma semana. Durante 55 dias, três grupos de 30 peixes foram submetidos ao condicionamento da água com o probiótico e três grupos não receberam este condicionamento, permanecendo como controle. A adição da levedura na água foi feita semanalmente seguindo a metodologia recomendada pelo fabricante. Foi realizada a quantificação da *Saccharomyces* através da metodologia descrita por Tournas *et al.* (2001), a concentração foi de  $5,6 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup>.

Os tanques que receberam o condicionamento com o probiótico possuíam sistemas individuais de recirculação de água, enquanto que os tanques sem condicionamento estavam conectados a um sistema central de recirculação de água. Todos os tanques receberam aeração constante, sendo que o oxigênio dissolvido na água e a temperatura foram monitorados diariamente através de oxímetro (YSI), enquanto que o pH e a amônia total, semanalmente, através de kits específicos.

Os peixes foram pesados periodicamente para avaliação do ganho de peso, conversão alimentar e ajuste da taxa alimentar, a qual foi gradativamente reduzida de 7% da biomassa de cada tanque por dia, no início do experimento, para 5% da biomassa, no final (Kubitza 2000). A ração comercial (41,5% proteína bruta) foi fornecida três vezes ao dia, às 8 h, 13 h e 18 h.

Para a determinação da composição corporal inicial, duas amostras de 20 peixes foram trituradas e homogeneizadas, sendo que uma alíquota de aproximadamente 80 g foi retirada para as análises de proteína bruta, energia bruta e matéria seca. O mesmo procedimento foi adotado para a análise da composição final dos peixes, sendo retirada uma amostra de 2 peixes por tanque.

### **Desafio com bactéria patogênica**

Ao final do ensaio alimentar, os peixes foram submetidos a um desafio com a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila hydrophila* CPQBA 228-08 DRM, gentilmente cedida pelo setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC) para avaliação da resistência à infecção. Os peixes de cada unidade experimental foram subdivididos em dois grupos de igual número: o primeiro grupo recebeu 0,4 mL de uma solução contendo o patógeno *Aeromonas hydrophila* ( $10^7$  células mL<sup>-1</sup>) por injeção intraperitoneal e, o segundo grupo, permaneceu como controle da infecção, recebendo injeção intraperitoneal de 0,4 mL de uma solução salina. Os peixes ficaram em observação durante 96 h, quando foram registrados os sinais clínicos e a mortalidade.

### **Ensaio de digestibilidade**

Neste ensaio, foi avaliado o efeito do mesmo probiótico comercial na digestibilidade da proteína, energia e matéria seca de uma ração comercial (40,5% proteína bruta), mas desta vez a suplementação foi feita na dieta. Três grupos de peixes receberam a ração suplementada, enquanto que, outros três, a ração sem suplementação (controle). A suplementação da ração foi feita conforme a instrução do fabricante, resultando em uma concentração de  $4,0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>, confirmada através da quantificação em laboratório utilizando a metodologia de Tournas *et al.* (2001). Cada grupo era constituído por 8 peixes, com peso médio de 230 g ( $\pm$  10 g, desvio padrão), oriundos de uma piscicultura comercial, e aleatoriamente distribuídos em seis tanques cilíndrico-cônicos com volume de 200 L. Estes tanques estavam acoplados a um sistema de recirculação de água, com troca parcial de 10 a 15 L min<sup>-1</sup>, equipado com aeração e controle de temperatura. A qualidade da água foi aferida pela determinação diária do oxigênio dissolvido e temperatura com oxímetro (YSI), bem como pela medida semanal do pH e concentração de amônia total, através de kits específicos.

Foi utilizado o método indireto na determinação da digestibilidade, com o uso de 0,5% de óxido de crômio na ração, como indicador e a coleta de fezes feita após sedimentação, em tanques cilíndrico-cônicos de 200 L, equipados com tubo coletor (50 mL) no fundo de cada tanque. Durante a coleta das fezes, os tubos ficavam inseridos dentro de caixas de isopor com gelo para evitar a degradação das fezes. As coletas foram feitas duas vezes ao dia, em intervalos de 6 h (24 h e 6 h), durante quatro semanas, até atingir 10 g de matéria seca para cada tanque. A metodologia de coleta de fezes foi a mesma descrita por Oliveira Filho & Fracalossi (2006), apenas com uma modificação: os animais permaneceram nos mesmos tanques durante a alimentação e a coleta de fezes. Entretanto, cada coleta de fezes era precedida de uma limpeza rigorosa das paredes do tanque, bem como de uma troca de 90% da água, para evitar contaminação das fezes com restos de ração e/ou com filme bacteriano formado nas paredes do tanque. Os tubos coletores contendo as fezes resultantes das coletas eram centrifugados a  $2,296 \times g$  por 5 min. O líquido sobrenadante era descartado e as fezes, secas em estufa (50 °C) durante 24 h. Após esse período, as fezes eram trituradas e congeladas a -20 °C para posterior análises.

Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais três vezes ao dia, às 8 h, 12 h e 16 h, com uma quantidade de ração equivalente a 3% do peso vivo para cada tanque (Kubitza 2000). A concentração do marcador externo, óxido de crômio (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), foi medida na ração, assim como nas fezes, para estimar o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e energia da ração comercial com e sem a suplementação do probiótico, segundo as equações:

Para matéria seca (Belal 2005):

$$CDA\% = 100 - \frac{100 \times \% \text{indicador na ração}}{\% \text{indicador nas fezes}}$$

Para proteína e energia (Nose 1960):

$$CDA\% = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{\% \text{marcador na dieta}}{\% \text{marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{nutriente nas fezes}}{\% \text{nutriente na dieta}} \right) \right]$$

### ***Histologia dos intestinos***

Foram coletadas amostras do intestino anterior, médio e posterior de dois peixes por tanque de cada tratamento, tanto no ensaio de crescimento quanto no ensaio de digestibilidade, para confirmação da colonização pela levedura, quando adicionada à água ou à ração, bem como para detectar possíveis alterações morfológicas ocasionadas pela adição do probiótico.

As amostras foram fixadas em formol tamponado com fosfato 0,1 M a pH 7,2 durante um mínimo de 48 h. Posteriormente foram lavadas em água corrente durante 2 h. Depois de cuidadosa desidratação em etanol, utilizou-se a metodologia de rotina (Cargnin-Ferreira & Sarasquete 2008), para a inclusão em parafina a 58°C, utilizando o xilol como líquido intermediário. Após a inclusão do material em parafina, os blocos resultantes foram cortados em micrótomo Leica RM 2025 com espessura de 5 µm. Os cortes foram então estirados e recolhidos em banho termostático a 52°C e dispostos sobre lâminas gelatinizadas. Os cortes foram desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados com a técnica tricrômica de Cason (Cargnin-Ferreira & Sarasquete 2008). O uso desta técnica em detrimento da coloração bicromática hematoxilina-eosina foi adotado por propiciar uma melhor visualização de compostos protéicos e glicídicos, bem como a diferenciação de estruturas morfológicas similares.

As preparações histológicas dos intestinos anterior, médio e posterior foram fotografadas em um microscópio de luz (Olimpus, mod. Dx 41) com sistema de captura de imagem digital acoplado (Sony Exwave Had). Posteriormente, as imagens foram analisadas em um programa de imagem (Chtool) especialmente desenvolvido pelo Projeto Cyclops (Depto. de Informática – UFSC) para análises histopatológicas.

### ***Análises proximais das rações, fezes e composição corporal dos peixes***

A análise da composição proximal das rações comerciais utilizadas no ensaio de crescimento e no ensaio de digestibilidade foi realizada conforme procedimentos descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1999) (Tabela 1). A umidade foi determinada por secagem a 105°C em estufa até peso constante; a matéria mineral, por queima a 550°C em forno mufla; a proteína bruta, por digestão ácida (N x 6,25, método de Kjeldahl); o extrato etéreo, pelo método de Soxhlet, após digestão ácida; a fibra em detergente ácido e a energia bruta em bomba calorimétrica.

No ensaio de crescimento, foram também determinados o ganho em peso e a conversão alimentar, segundo as equações:

$$\text{Ganho em peso (g)} = GP = (Pf - Pi)$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (\%)} = TCE = 100 \times (\ln Pf - \ln Pi) / t$$

$$\text{Convers\~ao alimentar} = CA = Q_{ro} / GP$$

Onde:  $P_f$  = peso m\u00e9dio (g) no final do experimento;  $P_i$  = peso m\u00e9dio (g) no in\u00edcio do experimento;  $Q_{ro}$  = quantidade de ra\u00e7\u00e3o ofertada.

No ensaio de digestibilidade, foi analisada a concentra\u00e7\u00e3o de \u00f3xido de cr\u00f4mio nas ra\u00e7\u00f5es e nas fezes, utilizando-se a metodologia descrita por Bremer *et al.* (2003). As fezes foram analisadas para determinar sua concentra\u00e7\u00e3o em energia bruta, prote\u00edna bruta e mat\u00e9ria seca, conforme descrito para an\u00e1lise das ra\u00e7\u00f5es comerciais.

A an\u00e1lise da composi\u00e7\u00e3o corporal inicial e final dos peixes no ensaio de crescimento incluiu a determina\u00e7\u00e3o da prote\u00edna bruta, energia bruta e mat\u00e9ria seca, conforme descrito para as ra\u00e7\u00f5es, para o c\u00e1lculo da taxa reten\u00e7\u00e3o da prote\u00edna e energia da dieta, segundo as equa\u00e7\u00f5es:

$$\text{Taxa de reten\u00e7\u00e3o prot\u00e9ica (\%): TRP} = \frac{[\text{peso corporal final (g)} \times \text{prote\u00edna corporal final (\%)}] - [\text{peso corporal inicial (g)} \times \text{prote\u00edna corporal inicial (\%)}]}{\text{prote\u00edna consumida (g)} \times 100}$$

$$\text{Taxa de reten\u00e7\u00e3o de energia (\%): TRE} = \frac{[\text{peso corporal final (g)} \times \text{energia corporal final (\%)}] - [\text{peso corporal inicial (g)} \times \text{energia corporal inicial (\%)}]}{\text{energia consumida (kcal)} \times 100}$$

**Tabela 1.** M\u00e9dia da composi\u00e7\u00e3o proximal das ra\u00e7\u00f5es comerciais para til\u00e1pia utilizadas no ensaio de crescimento e no ensaio de digestibilidade.

Fra\u00e7\u00e3o	Crescimento	Digestibilidade
	%	
Umidade	7,00	9,46
Prote\u00edna bruta	41,60	40,50
Mat\u00e9ria mineral	10,31	10,27
Extrato et\u00e9reo	7,50	7,49
Fibra em detergente \u00e1cido	5,08	5,86
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4.021	4.128

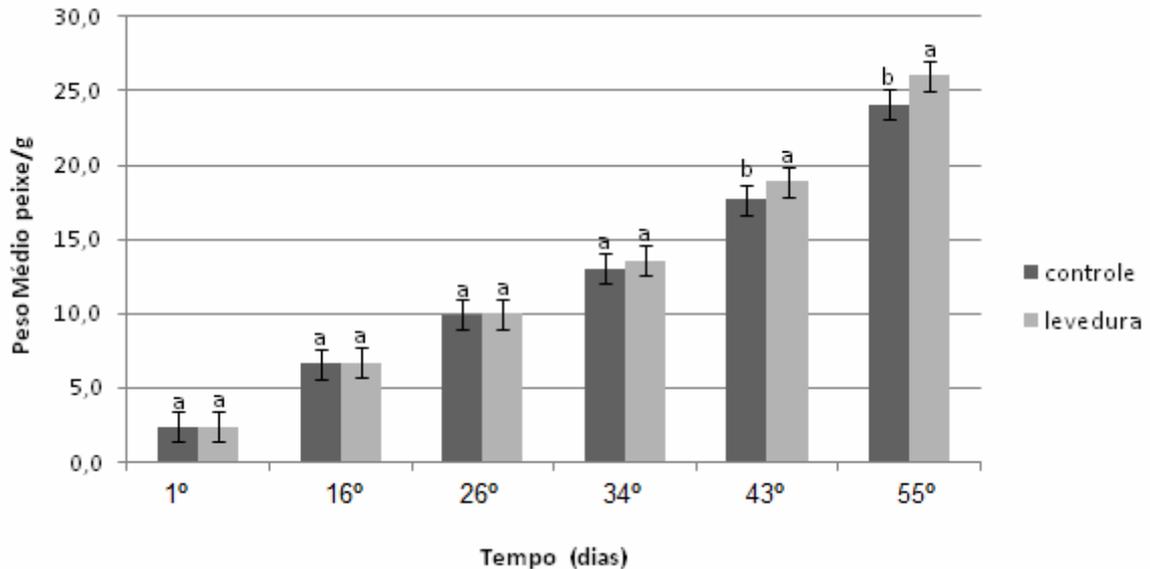
### **An\u00e1lise estat\u00edstica**

Todos os dados obtidos nos ensaios de crescimento, desafio e digestibilidade foram submetidos ao teste t, para avaliar o efeito da suplementa\u00e7\u00e3o com o probi\u00f3tico. O n\u00edvel de signific\u00e2ncia adotado foi de 5%.

### **Resultados e Discuss\u00e3o**

Os valores m\u00e9dios observados para qualidade de \u00e1gua no ensaio de crescimento foram: temperatura (28 \u00b1 0,5 \u00b0C), pH (6,5 \u00b1 0,3); oxig\u00eanio dissolvido (6,0 \u00b1 0,7 mg L<sup>-1</sup>) e am\u00f4nia total (<0,25 mg L<sup>-1</sup>). E no ensaio da digestibilidade foram (27 \u00b1 0,7 \u00b0C); pH (6,80 \u00b1 0,2); oxig\u00eanio dissolvido (6,0 \u00b1 0,4 mg L<sup>-1</sup>) e am\u00f4nia total (<0,25 mg L<sup>-1</sup>). Tanto no primeiro ensaio quanto no segundo os valores mostraram-se adequados para o cultivo de til\u00e1pia, conforme descrito por Balarin & Hatton (1979) e Popma & Lovshin (1994).

Não houve mortalidade nos ensaios de crescimento e digestibilidade. A Figura 1 apresenta a evolução do peso médio dos peixes quando cultivados em água condicionada com probiótico em relação ao controle ao longo do período experimental. A diferença em peso se tornou significativa a partir do 43º dia de experimento.



**Figura 1.** Evolução do peso médio de alevinos de tilápia do Nilo com e sem suplementação de probiótico (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*) na água de cultivo, ao longo do período experimental. O peso inicial médio ( $\pm$  desvio padrão) dos peixes foi 2,4 g  $\pm$  0,5. Barras com letras diferentes, dentro do mesmo período, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 2 sumariza as variáveis de crescimento e utilização dos nutrientes da dieta. O ganho em peso e a conversão alimentar foram afetados significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo condicionamento da água com o probiótico, quando comparados com o tratamento controle. Houve maior retenção da proteína e energia da dieta nos peixes cultivados na água condicionada com o probiótico (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores médios de ganho em peso, conversão alimentar, crescimento específico e taxa de retenção protéica e energética de alevinos de tilápia do Nilo cultivados em água condicionada ou não com probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*).

Variáveis	Controle	Água condicionada com probiótico <sup>1</sup>
Ganho em peso, g	21,70 $\pm$ 0,81 <sup>b</sup>	23,60 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
Conversão alimentar	1,34 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	1,28 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Taxa de crescimento específico, %	4,25 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	4,36 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
Taxa de retenção protéica, %	27 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	29,5 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>
Taxa de retenção energética, %	22,5 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	24,4 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Ver texto para detalhamento.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

A composição corporal dos peixes não foi alterada significativamente com o condicionamento da água com o probiótico ( $p>0,05$ , Tabela 3).

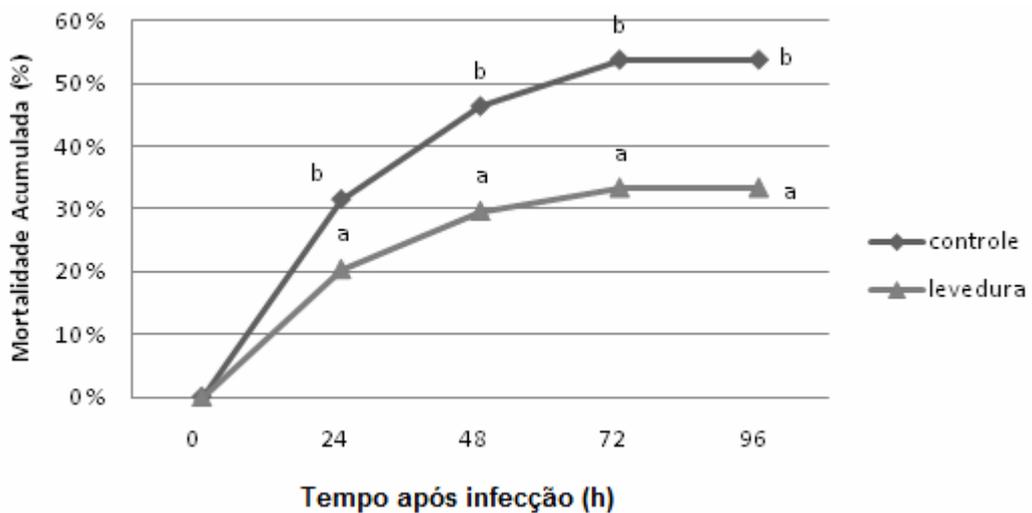
**Tabela 3.** Valores médios da composição corporal (matéria úmida) de alevinos de tilápia do Nilo cultivados em água condicionada ou não com probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) por 55 dias (dados expressos na matéria úmida).

Composição corporal %	Controle	Água condicionada com levedura <sup>1</sup>
Umidade	74,13 <sup>a</sup>	74,78 <sup>a</sup>
Proteína bruta	15,06 <sup>a</sup>	15,89 <sup>a</sup>
Extrato etéreo	3,92 <sup>a</sup>	3,90 <sup>a</sup>
Matéria mineral	5,29 <sup>a</sup>	5,39 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Ver texto para detalhamento.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Houve uma diminuição significativa na mortalidade 96 h após infecção ao patógeno nos grupos de peixes submetidos ao condicionamento da água com o probiótico de 56% para 33% em relação ao controle (Figura 2). A diferença na mortalidade começou a ser significativa 24 h após a infecção. Não houve mortalidade nos grupos de peixe que receberam a solução salina (controle da infecção experimental).



**Figura 2.** Mortalidade acumulada de alevinos de tilápia do Nilo criados em água condicionada ou não com probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) por 55 dias, após desafio com o patógeno *Aeromonas hydrophila*.

O condicionamento da água com o probiótico comercial à base de levedura propiciou um aumento significativo no ganho em peso, conversão alimentar, taxa de retenção protéica e energética de alevinos de tilápia. Resultados semelhantes foram obtidos para tilápia quando probióticos a base desta mesma levedura foram suplementados na ração (Meurer *et al.* 2000; Lara-Flores *et al.* 2003; Pezatto *et al.* 2006; Hisano *et al.* 2007; Mohsen *et al.* 2008). Entretanto, o presente estudo demonstra um efeito positivo quando a levedura é adicionada à água. O controle nas condições experimentais, tais como temperatura e vazão de água, passível de ser realizado em experimentos de laboratório,

provavelmente contribuíram para os resultados positivos observados. Contudo, o efeito desta suplementação deve ser investigado a campo, já que, apesar de estatisticamente significativo, o aumento no ganho em peso foi de somente 8,8% em relação ao controle, em 55 dias.

O condicionamento da água com o probiótico comercial à base de levedura também proporcionou um aumento na resistência da tilápia à infecção pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*. Resultados semelhantes foram observados em tilápia por Mohsen e colaboradores (2008), quando esta levedura foi suplementada na ração, além de um aumento significativo na quantidade de imunoglobulina plasmática em truta (*Oncorhynchus mykiss*) (Siwicki *et al.* 1994) e em respostas imunes não específicas em dourada (*Sparus aurata*) (Ortuño *et al.* 2002). Novamente, estas são evidências importantes de melhoria na saúde geral dos peixes, mas necessitam de comprovação em experimentos a campo para justificar um maior gasto com mão de obra para aplicação semanal em empreendimentos comerciais.

As médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína e energia da ração comercial, suplementada com o probiótico, encontram-se sumarizadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Média dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, matéria seca e energia bruta de uma ração comercial com e sem a suplementação de probiótico (cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*) para a tilápia do Nilo.

Coeficiente de Digestibilidade Aparente	Ração Comercial sem Suplementação	Ração Comercial Suplementada com a Levedura
Matéria seca	70,5 ± 1,10 <sup>b</sup>	74,3 ± 1,50 <sup>a</sup>
Proteína	83,5 ± 0,67 <sup>b</sup>	85,4 ± 0,48 <sup>a</sup>
Energia	77,0 ± 2,20 <sup>b</sup>	81,4 ± 0,70 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias na linha, seguidas das mesmas letras, não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

A suplementação da ração comercial com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* propiciou uma significativa melhora na digestibilidade da matéria seca, proteína bruta e energia bruta ( $p < 0,05$ ) para tilápia do Nilo, quando comparada à ração comercial sem suplementação. Estes resultados concordam com aqueles relatados para tilápias da mesma espécie, com peso menor 152 g e 83 g em Lara-Flores *et al.* 2003 e Hisano *et al.* 2008, respectivamente que os peixes utilizados no presente estudo (230 g). Alguns autores sugerem que a melhora na digestibilidade ocorre em função da presença de nutrientes (vitaminas) e enzimas no probiótico, o que pode favorecer o aproveitamento dos nutrientes pelos peixes (Machado 1997). Entretanto, a possibilidade de uma economia de energia e nutrientes pela melhora na saúde geral dos peixes, proporcionada pela suplementação da ração com a levedura também deve ser considerada.

Não foi observada qualquer alteração morfológica nos intestinos dos peixes em ambos os ensaios. A análise das imagens constatou a presença significativa de células de *Saccharomyces* no trato gastrointestinal dos peixes que receberam a suplementação, tanto no ensaio de crescimento quanto no ensaio de digestibilidade.

O condicionamento da água com um probiótico comercial a base de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) promoveu um maior ganho em peso, conversão alimentar e retenção de energia e proteína da dieta, além de promover um aumento na resistência de tilápia do Nilo após

desafio com patógeno, em condições de laboratório. A suplementação da ração com este probiótico também melhorou a digestibilidade da matéria seca, proteína e energia de uma ração comercial.

### Referências Bibliográficas

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1999) *Official Methods of Analysis*. 16.ed. Washington, D.C., 1141p.
- Balarin J.D., Hatton J.P. (1979) *Tilapia: A Guide to their Biology and Culture in Africa*, Pisces Press, University of Stirling, Scotland, 147p.
- Balcázar, J.L., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. & Múzquiz J.L. (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, **114**, 173-186.
- Bremer Neto H., Graner C.A.F., Pezzato L.E., Padovani C.R. & Cantelmo O.A. (2003) Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **32**, 249-255.
- Cargnin-Ferreira E. & Sarasquete C. (2008) *Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos*. Ed. CSIC, Madrid, 94p.
- Castro C.A.S. & Cervon M.F. (2004) Efecto Del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) al ser proposto como promotor de crescimento. *Redvet*, **4**, 0-13.
- Correa G.S.S., Gomes A.V.C., Corrêa A.B., Salles A.S. & Fernando Augusto Curvello (2002) Digestibilidade da ração de frangos de corte suplementados com probióticos e antibiótico. *Ciência Rural*, Santa Maria, **32**, 687-691.
- De Schrijver R., Ollevier F. (2000) Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, **186**, 107– 116.
- Fitzsimmons K. (2000). Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: *Symposium on Tilapia Aquaculture*, 5. Rio de Janeiro, 2000. *Anais*. Rio de Janeiro: SRG Gráfica & Editora LTDA, 3-8.
- Garrigues D. & Arevalo G. (1995) An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post-larvae in Ecuador. In: Browdy C.L., Hopkins J.S. (Eds.), *S- wimming through troubled water*. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. Baton Rouge, *World Aquaculture Society*, 53–59.
- Heyman M. & Ménard S. (2002) Review – Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 1151-1165.
- Hisano H., Narváez-Solarte W.V., Barros M.M. & Pezzato L.E. (2007) Desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com levedura e derivados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, **42**, 1035-1042.
- Hisano H., Sampaio F.G., Barros M.M. & Pezzato L.E. (2008) Digestibilidade aparente de rações contendo levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular pela tilápia do Nilo. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, **34**, 281 – 287.
- Jones F.T. (1991) Use of direct-fed microbials not new: way work still not clean. *Feedstuffs*, **63**, 17-19.
- Jorgensen M. (1989) Probiotics – a survey. A alternative to antibiotics in the feed of forbearing animals. *Scientifur*, **12**, 247-249.
- Korniewicz A. (1992) Feed additives in swine feeding. *Inst. Zoot Biol Inform*, **30**, 66-90.
- Kubitza F. (2000) *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: F. Kubitza. 289 p.
- Lara-Flores M., Olvera-Novoa M.A., Guzmán-Méndez B.E. & López-Madrid W., (2003) Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **216**, 193-201.
- Machado P.F. (1997) Uso da levedura desidratada na alimentação de ruminantes. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal. *Anais...* Campinas, Brazil: CBNA, 111-128.

- Meurer F., Hayashi C., Soares C.M. & Boscolo W.R. (2000) Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum*, **22**, 479-484.
- Mohsen A.T., Azza M.A.R., Ismael N.E.M. (2008) Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, **280**, 185-189.
- Moriarty D. (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, **151**, 333-349.
- Nose T. (1960) On the digestion of food protein by goldfish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). *Bulletin Freshwater Fisheries Research Laboratory*, Tokyo, **10**, 11-22.
- Oliveira Filho P.R.C. & Fracalossi D.M. (2006) Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, **35**, 1581-1587.
- Ortuño J., Cuesta A., Rodríguez A., Esteban M.A. & Meseguer J. (2002) Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **85**, 41-50.
- Owings W.J., Reynoldas D.L., Hasiak R.J. & Ferket P.R. (1990) Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. *Poultry Science*, **69**, 1257-1264.
- Pezzato L.E., Menezes A., Barros M.M., Guimarães I.G. & Schich D. (2006) Levedura em dietas para alevinos de tilápia do Nilo. *Veterinária e Zootecnia*, **13**, 84-94.
- Plumb J.A. (1999) *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. 2nd ed. Ames: Iowa State University, 328p.
- Popma T. J., Lovshin L., (1994) Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Auburn-Alabama: *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments*, 40p.
- Siwicki A.K., Anderson D.P., Rumsey G.L. (1994) Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and immunopathology*, **41**, 123-139.
- Suida D. (1994) *Estimulantes do desempenho de galinhas poedeiras e de frangos de corte*. Viçosa: UFV, 59p.(Dissertação - Mestrado em Zootecnia).
- Suzer C., Çoban D., Kamaci H.O., Saka S., Firat K., Otgucuoğlu Ö. & Küçüksari H., (2008) *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, **280**, 140-145.
- Swain S.K., Rangacharyulu P.V., Sarkar S. & Das K.M. (1996) Effect of a probiotic supplement on growth, nutrient utilization and carcass composition in mrigal fry. *Journal of Aquaculture*, **4**, 29-35.
- Tournas V., Stack M.E., Mislivec P.B., Koch H.A., Bandler R. (2001) Yeast, molds and mycotoxins. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 15 de maio de 2009.
- Tovar D., Zambonino J., Cahu C., Gatesoupe F.J., Vázquez-Juárez R. & Lésel R. (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, **204**, 113-123.
- Verschuere L., Geert Rombaut G., Sorgeloos P. & Verstraete W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 655-671.
- Winton J.R. (2001) Fish health management. In: Fish Hatchery Management, 2nd edn, ed. by G. Wedemeyer), 559-639. *American Fisheries Society*, Bethesda, USA.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em ambos os ensaios, os probióticos testados – o produto comercial a base da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria ácido-lática *Lactobacillus plantarum*, isolada do trato gastrointestinal da tilápia do Nilo – mostraram ser eficientes promotores de crescimento para tilápia do Nilo. Houve melhora no desempenho zootécnico dos animais, com aumento significativo no ganho em peso e conversão alimentar, além de um melhor aproveitamento dos nutrientes, com aumento significativo na retenção protéica e energética da ração. Entretanto, somente a suplementação com a levedura na ração proporcionou um aumento significativo na digestibilidade da matéria seca, energia e proteína da ração comercial.

Após receberem suplementação na ração com a bactéria ou na água com a levedura por 55 dias, os peixes apresentaram uma resistência superior à infecção pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*, diminuindo significativamente a mortalidade em comparação com os animais que não receberam os probióticos. Assim, os probióticos testados devem ser considerados como alternativas ao uso dos antibióticos e quimioterápicos.

A levedura também pode ser utilizada como suplemento probiótico através de sua adição na água. Esta se apresenta como uma forma mais prática quando comparada à sua adição diretamente na ração.

Ensaio a campo deverão ser realizados no futuro para determinar este incremento, pois todos os fatores podem influenciar nos resultados, e o laboratório é um ambiente propício para crescimento dos animais.

Análises econômicas devem ser realizadas para confirmar a viabilidade do uso dos probióticos no cultivo da tilápia do Nilo, pois sua inclusão irá depender de gastos extras, tanto econômicos quanto de mão de obra, para sua aplicação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- BACHÈRE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, v.227, p.427–438, 2003.
- BALARIN, J.D.; HALLER, R.D. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. In: MUIR, J.F.; ROBERTS, R.J. (Ed.). **Recent Advances in Aquaculture**. Londres: Croom Helm, p.267-355, 1982.
- BALCÁZAR, J.L. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, **National Center for Marine and Aquaculture Research**, Guayaquil, Ecuador, 2003.
- BALCAZAR, J.L., et al. The role of probiotics in aquaculture **Veterinary Microbiology**, v.114, n.31, p.173-186, 2006.
- BEST, P. Europa confirma la prohibición de antibióticos. **Indústria Porcina**, v.19, n.2, p.5-6, 1999.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 128p, 2003.
- BOWEN, S.H. Feeding, digestion and growth qualitative considerations. In: PULLIN, R.S.V.; LOWE-MC-CONNELL, R.H. Eds. **The Biology and Culture of Tilapias**. ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.,p.141–156, 1982.
- CASTRO, C.A.S.; CERVON, M.F. Efecto del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) al ser proposto como promotor de crescimento. **Redvet**, v.4 (2), p.0-13, 2004.
- CORREA, G.S.S. et al. Digestibilidade da ração de frangos de corte suplementados com probióticos e antibiótico. In: **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.687-691, 2002.
- COSTA, A.B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. Piracicaba, SP: USP, 2003. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração Ciência Animal e Pastagens) Universidade de São Paulo, 2003.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, n.4, p.245-253, 2002.
- CYRINO, J.E.P. et al. Desenvolvimento da criação de peixes em tanques-rede: uma análise dos fundamentos, viabilidade e tendências, baseada em experiências bem sucedidas no Sudeste do Brasil. In: AQUICULTURA BRASIL 98, 1. 1998. Recife. **Anais...** Recife: (SIMBRAQ), p.409-433, 1998.
- DA SILVA, A.B.; MELO, F.R.; LOVSHIN, L.L. **Observações Preliminares Sobre a Cultura Monossexo da *Tilapia nilotica* Linnaeus (macho) em Viveiro, em Comparação com Híbridos Machos de Tilapia, com o Uso de Ração Suplementar e Fertilizantes**. Fortaleza: DNOCS, 8 p. 1975.
- DALL, W.; MORIARTY, D.J.W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Mantel, L.H. (Ed.), **The Biology of Crustacea**, vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, 1983.
- DALMIN, G.; KATHIRESAN, K.; PURUSHOTHAMAN, A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p.939–942, 2001.

DE SCHRIJVER, R., OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, v.186, p.107– 116, 2000.

DE VRESE, M. et al. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.421-429, 2001.

ECCLES, D.H. FAO species identification sheets for fishery purposes. **Field guide to the freshwater fishes of Tanzania**. Prepared and published with the support of the United Nations Development Programme (project URT/87/016). FAO, Rome. 145 p., 1992.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v.179, p.149-168, 1999.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 14 de dez. de 2008.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: **Symposium on Tilapia Aquaculture**, 5., Rio de Janeiro, 2000. Anais. Rio de Janeiro: SRG Gráfica & Editora LTDA, p.3-8, 2000.

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

FULLER, R. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), **Probiotics: the Scientific Basis**. Chapman and Hall, London, p.1–8, 1992.

GARRIQUES, D., AREVALO, G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post-larvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *S-wimming through troubled water*. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. Baton Rouge, **World Aquaculture Society**, p.53–59, 1995.

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

GODOY, M.P. **Criação de Peixe**. Pirassununga: Est. Exp. Biol. Piscicultura. 2a ed. São Paulo. 24 p. 1959.

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

HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUIS INT'VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics: the Scientific Basis**. London : Chapman e Hall, p.209-224, 1992.

HISANO, H. et al. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum-Biological Sciences**, v.28, n.4, p.311-318, 2006.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.73, n.2, p.365-373, 2001.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2- 3, p.109-116, 2002.

IBAMA. **Estatísticas da pesca 2005 – Brasil**, Grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 147p. 2007.

IGFA, 2001. **Database of IGFA angling records until 2001**. IGFA, Fort Lauderdale, USA.

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

- JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia do Nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.2, 2008.
- JONES, F.T. Use of direct-fed microbials not new: way work still not clean. **Feedstuffs**, v.63, n.1, p.17-19, 1991.
- JORGENSEN, M. Probiotics – a survey. A alternative to antibiotics in the feed of forbearing animals? **Scientifur**, v.12, n.4, p.247-249, 1989.
- KANAMORI, Y. et al. Combination Therapy with Bifidobacterium breve, Lactobacillus casei and Galactooligosaccharides Dramatically Improved the Intestinal Function in a Girl with Short Bowel Síndrome. **Digestive Diseases and Sciences**, v.46, n.9, p.2010-2016, 2001.
- KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Macrophage activation by Lactobacillus casei in mice. **Microbiology and Immunology**, v.27, n.7, p.611-618, 1983.
- KORNIEWICZ, A. Feed additives in swine feeding. **Institute Zootechnical Biul Information**, v.30, n.3-6, p.66-90, 1992.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 289 p., 2000.
- KUMAR, R. et al. Enhanced innate immune parameters in Labeo rohita (Ham.) following oral administration of Bacillus subtilis. **Fish and Shellfish Immunology**, v.24, p.168-172, 2008.
- LAIHO, K. et al. Probiotics: ongoing research on atopic individuals. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.19-27, 2002.
- LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, n.3659, p.747-748, 1965.
- LEWIN, C.S. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms. In: Michel, C., Alderman, D.J. (Eds.), **Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality**. **Office International des Epizooties**, p. 288-301, 1992.
- LOVSHIN, L. L. Red tilapia or Nile tilapia: which is the best culture fish? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998. p. 179.
- LUND, V. C. X.; FIGUEIRA, M. L. O. A. **Criação de Tilápias**. São Paulo: Nobel, 1989.
- MAKRIDIS, P.; FJELLHEIM, A.J.; SKJERMO, J. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or biencapsulated in rotifers. **Aquaculture International**, v.6, p.367-380, 2000.
- MATSUZAKI T, CHIN J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.67-73, 2000.
- MCANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationships and biogeography. In: BEVERIDGE, M.C.M.; MCANDREW, B.J (Eds). **Tilapias: Biology and Exploitation**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.1-32, 2000.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 19., 2001, Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba: SBZ, p.151-157, 2001.
- MEURER, F.; et al. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.35, n. 5, p.1881-1886, 2006.

MEURER, F. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como probiótico para as fases iniciais do cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Tese de doutorado em zootecnia, Universidade estadual de Maringá. Maringá, Março de 2005.

MORIARTY, D. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.151, p.333–349, 1997.

MULDER, R.W.; HAVENAAR, R.; HUIS INT' VELD, J.H. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. In: Fuller, R. (Ed.) **Probiotics 2: Applications and Practical Aspects**. Chapman and Hall, London, p. 187–207, 1997.

NAIDU A.S.; BIDLACK W.R.; CLEMENS R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**; v.39, p.113-26, 1999.

NAYAK S.K.; SWAIN P.; MUKHERJEE S.C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p. 892-896, 2007.

NOGAMI, K.; MAEDA, M. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**. v.49, p.2373–2376, 1992.

NOGAMI, K., et al. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. **Hydrobiologia**. v.358, p.291–295, 1997.

OUWEHAND, A.C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v.9, n.1, p.43- 52, 1999.

OWINGS, W.J., et al. Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. **Poultry Science**, v.69, p.1257-1264, 1990.

PHILIPPART, J.C.L.; RUWET, J.C.L. Ecology and distribution of tilapias. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. Eds., **The Biology and Culture of Tilapias**. ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. p.15–59, 1982.

PIRARAT, N., et al., Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.113, p.339-347, 2006.

POPMA, T.J., PHELPS, R.P. Status report to commercial tilapia producers on monosex x fingerling productions techniques. In: AQUICULTURA BRASIL, 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, p.127-145, 1998.

PRIEUR D., et al. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, v.28, p.277-352, 1990.

PROENÇA, C.E.M. ; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de Piscicultura Tropical**. Brasília, IBAMA, 1994.

RENGPIPAT, S., et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p.271–288, 2000.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SAKAI, M., et al. Enhance- ment of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyr- icum* bacteria. **Journal of Fish Diseases**, v.18, p.187–190, 1995.

- SAKATA, T. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. In: Lesel, R. (Ed.), **Microbiology in Poecilotherms**, p. 171–176, 1990.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, n.5-6, p.563-572, 1998.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.361-364, 2001.
- SILVA, E.N.; ANDREATTI, R.L.F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria, RS. **Anais... Concórdia, SC: EMBRAPA SUÍNOS E AVES**, v.1, p.45-55, 2000.
- SIMHON A, et al. Effect of feeding in infants' faecal flora. **Archives of Disease in Childhood**, 1982.
- SUZER, C. et al. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 280, p.140-145, 2008.
- VERSCHUERE L., et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000.
- VIEIRA, F. do N. et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.55, p.251-255, 2007.
- WAGNER, P.M., et al. Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2004.
- WANG Y.B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, p. 259-264, 2007.
- WANG Y.B., et al. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v.277, p.203-207, 2008.
- WANG, X., et al. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). **Journal of Ocean University of Qingdao**, v.30, p.493–498, 2000.
- WINTON J.R. Fish Health Management. In: **Fish Hatchery Management**, 2nd edn, ed. by G. Wedemeyer), p. 559-639. American Fisheries Society, Bethesda, USA. 2001.
- YOKOKURA, T. et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota – Intestinal Flora Human Health. **Edited by Yakult Central Institute for Microbiological Research**, p. 8, 1999.
- ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das chitraladas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v.10, n.60, p.15-19, 2000.