INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

Bactérias celulolíticas e o uso de resíduo de maracujá (*Passiflora edulis*) em rações extrusadas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

FÁBIO XAVIER WEGBECHER

Manaus, Amazonas.
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

Bactérias celulolíticas e o uso de resíduo de maracujá (*Passiflora edulis*) em rações extrusadas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

FÁBIO XAVIER WEGBECHER

ORIENTADOR: Dr. MANOEL PEREIRA FILHO

CO-ORIENTADOR: Dr. TAKESHI MATSUURA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, área de concentração: Piscicultura.

Manaus, Amazonas.
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

W411 Wegbecher, Fábio Xavier
Bactérias celulolíticas e o uso de resíduo de maracujá (*Passiflora edulis*) em rações extrusadas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)/
Fábio Xavier Wegbecher.--- Manaus : [s.n.], 2010.
xiii, 90 f. : il.

Tese (doutorado)-- INPA, Manaus, 2010
Orientador : Manoel Pereira Filho
Co-orientador : Takeshi Matsura
Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Tambaqui – Alimentação e rações. 2. Piscicultura. 3. Nutrição animal. 4. Microbiologia. I. Título.

CDD 19. ed. 597.50414

Sinopse:

Níveis (0, 10, 20 e 30%) de torta de semente de maracujá (TSM) foram incluídos em rações extrusadas e testados quanto ao coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das rações. O nível de inclusão de 10% de TSM não alterou a digestibilidade da ração para juvenis de tambaquis, o que significa que pode ser incluído sem prejuízo à digestibilidade para a espécie. Os demais níveis de TSM testados resultaram em CDAs semelhantes, despontando o volume fibroso das mesmas como atenuante para a digestibilidade. A partir daí, inocularam-se concentrações crescentes de uma linhagem bacteriana produtora de celulases, isolada de intestino de tambaqui selvagem em ração contendo 30% de TSM. Os resultados demonstraram que a linhagem bacteriana utilizada não alterou a digestibilidade, o desempenho produtivo e a composição corporal dos peixes.

Palavras-chave: bactéria, celulase, isolamento.

Dedico à minha avó Maria Santin e aos meus filhos Bruno e Gabriela Damasceno Wegbecher.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Ao Projeto Aquabrasil, pelo suporte financeiro, com recursos do Ministério da Pesca e Aqüicultura, via Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo suporte financeiro ao projeto.

Ao Dr. Manoel Pereira Filho, pela orientação, paciência e pela grande amizade.

Ao Dr. Takeshi Matsuura, pela co-orientação e sugestões.

À Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva, pelas fundamentais análises enzimáticas.

À Dra. Coordenadora do curso Angela Varella, que por intermédio das secretárias Carminha Arruda e Elany Alves, aceleraram os processos burocráticos.

À Sra. Maria Inês de Oliveira Pereira e ao Sr. Evandro de Souza, pela dedicação e competência nas análises bromatológicas e fabricação das rações.

À Dra. Elizabeth Gusmão e equipe, pela colaboração nas análises de água.

Ao Sr. Alexandre Honczarick, pelo fornecimento dos alevinos e aos Srs. Atílio e Marquinhos, pelo zelo com os estoques de peixes.

Às Sras. Suzana Kawashima e Maria de Fátima dos Santos, pela preocupação e cuidados com o bem estar de todas as pessoas envolvidas nas rotinas diárias de trabalho.

Aos amigos de jornada Daniel Ituassú, Fábio Soller, Christian Peres, Esaú Carvalho, Geraldo Pereira e Liam Brandão pela troca de conhecimentos.

Aos amigos e excepcionais profissionais que muito auxiliaram: Flávio Augusto Leão da Fonseca, César Augusto Oishi, Eduardo Braga Fernandes e Expedita Pereira Filho, um eterno abraço.

À Ruth Cavalcante, André Nobre, Alcione Alfon e demais colaboradores pela presteza na execução dos procedimentos experimentais rotineiros.

À Liége Cardoso Castelani, minha irmã de alma.

À Fabiana Queiroz Damasceno pelo apoio logístico fundamental em Brasília.

Ao Ewerson Mercer, amigo de infância que tive a felicidade de encontrar por essas paragens... “mais um perdido na Amazônia”. Também não poderia deixar de mencionar o nome dos amigos Marcos Fioresi, Regina Silva, Jorge e Josi Carneiro: meus sinceros agradecimentos.

Ao irmão Eduardo e a meus queridos pais, Rudi e Rosinha Wegbecher, que mesmo distantes sempre foram fundamentais em minha vida.

Especialmente agradeço ao meu amor, Daniela Queiroz Damasceno, que me acompanhou em mais uma jornada, durante a qual me presenteou com dois lindos filhos: Bruno e Gabi.

RESUMO

O cultivo de tambaqui é uma atividade econômica em fase de expansão na Região Amazônica. Entretanto, os elevados gastos com alimentação retardam o crescimento da atividade, levando o produtor a utilizar rações não adequadas às necessidades nutricionais da espécie. Por tanto, são necessárias pesquisas acerca da utilização de vegetais em rações para tambaqui. No presente trabalho, dividido em três fases, foi utilizada a torta da semente de maracujá (TSM) como alimento alternativo, considerando a constituição de seus componentes fibrosos e a possibilidade de degradação deles por bactéria produtora de enzimas fibrolíticas. Na primeira fase, peixes foram coletados de rio e de tanques, a fim de constatar a presença de bactérias produtoras de celulases e quantificar as celulases e xilanases; na segunda fase, foi testada a inclusão crescente de TSM na digestibilidade de rações para peixes juvenis (0, 10, 20 e 30% de TSM); na terceira fase, utilizou-se a ração TSM 30% como substrato para a inoculação, em densidades crescentes, de uma linhagem bacteriana produtora de celulases e xilanase, que foi fornecida para juvenis de tambaqui, avaliando-se a digestibilidade, variáveis de desempenho produtivo e composição corporal. Os resultados da primeira fase demonstraram que tambaquis apresentam bactérias produtoras de celulases em seus intestinos e que a linhagem TR9 produziu maiores valores das celulases endo-β-glucanase, exo-β-glucanase e xilanase. Os resultados da segunda fase demonstraram que a inclusão de TSM a 10% não afetou a digestibilidade da ração, e que os demais níveis de inclusão mostraram a potencialidade da TSM como ingrediente alternativo. Os resultados da terceira fase demonstraram que a linhagem bacteriana TR9 utilizada não influenciou na digestibilidade, desempenho zootécnico e composição corporal dos peixes.

ABSTRACT

Tambaqui cultivation is an economic activity in a phase of expansion in the Amazonian Region. However, the high costs associated with feed somewhat reduce the activity's growth, leading the producer to use feed inappropriate for this specie's nutritional requirements. Consequently, research is required concerning the use of vegetables in tambaqui feed. This present study, divided into three phases, used passion fruit seed meal (PFSM) as an alternative food, due to the constitution of its fibrous components and the ability of fibrolytic enzyme-producing bacteria to break it down. In the first phase, fish were collected from the river and from the tanks with the objective of determining the presence of cellulose-producing bacteria and of quantifying cellulose and xylanase. In the second phase, increasing amounts of passion fruit seed meal were incorporated into the feed and tested for digestibility in juvenile fish (0, 10, 20 and 30% PFSM). In the third phase, 30% PFSM feed was used as a substract for inoculation in increasing densities of a cellulose and xylanase-producing bacteria strain, which was given to tambaqui, evaluating the digestibility, production performance variables and body composition. Results from the first phase demonstrated that cellulose-producing bacteria exist in tambaqui intestines and that the TR9 strain produced greater values of endo-β-glucanase, exo-β-glucanase and xylanase. Results from the second phase demonstrated that the incorporation of a 10% amount of PFSM did not affect the feed digestibility and that other percentage levels showed the PFSM's potential as an alternative ingredient. Results from the third phase reveal that the TR9 strain employed did not have any influence on the digestibility, zootechnic performance or body composition of the fish.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios de indução para as atividades enzimáticas de endo-β-glucanase, exo-β-glucanase, β-glucosidase e xilanase em pH 7.....25

Tabela 2 - Média e desvio padrão das UFCs dos intestinos de tambaquis de diferentes procedências. 29

Tabela 3 - Valores médios das atividades de endo-β-glucanase dos isolados bacterianos.....30

Tabela 4 - Valores médios das atividades de exo-β-glucanase dos isolados bacterianos.....32

Tabela 5 - Valores médios das atividades de β-glicosidase dos isolados bacterianos. 33

Tabela 6 - Valores médios das atividades de xilanase dos isolados bacterianos. 34

Tabela 7 - Valores médios das UFCs contadas nas rações.....34

Tabela 8 - Análise químico-bromatológica dos ingredientes das rações (g/100g MS). 51

Tabela 9 - Composição percentual das dietas experimentais. 52

Tabela 10 - Análise químico-bromatológica das rações experimentais.....56

Tabela 11 - Médias, regressão e coeficientes de determinação (r2) dos valores da Lignina, Celulose e Hemicelulose em função dos níveis de inclusão de TSM. 56

Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros monitorados de qualidade da água.....57

Tabela 13 - Coeficiente de digestibilidade aparente das rações contendo níveis crescentes de inclusão de torta de semente de maracujá para juvenis de tambaqui. 57

Tabela 14 - Médias, regressão e coeficientes de determinação (r2) dos valores de CDA da Celulose e Hemicelulose em função dos teores de lignina obtidos das fezes. 58

Tabela 15 - Composição percentual das dietas experimentais. 76

Tabela 16 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água monitorados.....81

Tabela 17 - Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das rações contendo níveis crescentes de inclusão da linhagem bacteriana TR9 para juvenis de tambaqui. 81

Tabela 18 - Valor médio e desvio padrão das variáveis de desempenho produtivo..82

Tabela 19 - Composição corporal de tambaquis juvenis alimentados com concentrações crescentes da linhagem bacteriana TR9 inoculadas em ração TSM30%.....82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rações experimentais com níveis crescentes de TSM: (A) 0%, (B) 10%, (C) 20% e (D) 30%. 53

Figura 2 - Unidades experimentais utilizadas para o acondiconamento dos juvenis de tambaqui (A); Detalhe dos Coletores de fezes (B) 53

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

CAA – Conversão alimentar aparente

CDA – Coeficiente de digestibilidade aparente

CDA_{ing} - Coeficiente de digestibilidade aparente do ingrediente testado

CHO – Carboidratos totais

CPAQ – Coordenação de Pesquisas em Aquicultura

CNE – Carboidrato não estrutural

DT – Digestibilidade total

ED – Energia digestível

EE – Extrato etéreo

FAN – Fatores antinutricionais

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

GP – Ganho de peso

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MS – Matéria seca

NRC – National Research Concil

OD – Oxigênio dissolvido

pH – potencial hidrogeniônico

PNA - Polissacarídeo não amiláceo

PB – Proteína bruna

T – temperatura

TCE – Taxa de crescimento específico

TCR – Taxa de crescimento relativo

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UFC – Unidade formadora de colônia

Tg – trato gastrointestinal

TSM – Torta de semente de maracuja

SUMÁRIO

1. Introdução Geral 1
1.1 Alimentação de tambaquis na natureza 2
1.2 Ingredientes alternativos em rações para tambaquis 3
1.3 Fibra na alimentação de peixes 5
1.4 Composição das fibras vegetais 6
1.5 Celulose 7
1.6 Celulase 7
1.7 Bactérias produtoras de celulase em peixes 8
2. Referências Bibliográficas 10
CAPÍTULO I - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE EM INTESTINO DE JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*). 18
Resumo 18
Abstract 19
1. Introdução 20
2. Objetivos 22
2.1 Objetivo geral 22
2.2 Objetivos específicos 22
3. Material e Métodos 23
4. Resultados 29
5. Discussão 35
6. Conclusão 38
7. Referências Bibliográficas 39
CAPÍTULO II - DIGESTIBILIDADE APARENTE, POR JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*), DE RAÇÕES EXTRUSADAS CONTENDO NÍVEIS CRESCENTES DE TORTA DE SEMENTE DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) 44
Resumo 44
Abstract 45
1. Introdução 46
1. Objetivos 49
2.1 Objetivo Geral 49
2.2 Objetivos Específicos 49
2. Material e Métodos 50
3.1 Digestibilidade aparente de nutrientes (CDAn) e energia (CDAeb) 54
3.2 Digestibilidade total (DT) 55
3.3 Energia digestível (ED) 55
3.4 Digestibilidade do ingrediente 55
3. Resultados 56
4. Discussão 59
5. Conclusão 62
6. Referências Bibliográficas 63
CAPÍTULO III - DIGESTIBILIDADE APARENTE, DESEMPENHO PRODUTIVO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO EXTRUSADA CONTENDO BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE E XILANASE 69
Resumo 69
Abstract 70
1. Introdução 71

2. Objetivos 74
2.1 Objetivo Geral 74
2.2 Objetivos Específicos 74
3. Material e Métodos 75
3.1 Digestibilidade aparente de nutrientes (CDAn) e energia (CDAeb) 78
3.2 Digestibilidade total (DT) 78
3.3 Energia digestível (ED) 78
3.4 Digestibilidade do ingrediente 79
4. Resultados 81
4.1 Variáveis de Desempenho Produtivo 82
4.2 Composição corporal 82
5. Discussão 84
6. Conclusão 87
7. Referências Bibliográficas 88

1. Introdução Geral

A bacia amazônica apresenta “pelo menos” 2.500 espécies de peixes, dentre as quais o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a mais conhecida (Araújo-Lima e Goulding 1997). Trata-se de um Characiforme que pode pesar 30kg e medir 90cm de comprimento (Goulding, 1980).

Bastante apreciada pelo consumidor local e, comercialmente, a mais importante na Amazônia central, a espécie chegou a representar 44% do peso total desembarcado no mercado municipal de Manaus, em 1976 (Petrere, 1983). Contudo, as populações provenientes de captura com rede começaram a apresentar diminuição nos tamanhos, conforme registros do início da década de 1980 (Araújo-Lima e Goulding 1997).

Sub-explorada até 1978 (Petrere, 1983), a maior parte das populações de tambaqui que apresentavam comprimento em torno de 30 cm foi densamente predada durante os períodos de seca (Merona e Bittencourt, 1988). Essa maneira de exploração adotada, associada à derrubada da floresta, constituiu forma de captura ameaçadora aos estoques naturais (Araújo-Lima e Goulding 1997). Com o intuito de suprir a demanda, as populações de tambaqui começaram a ser capturadas em locais cada vez mais distantes (Merona e Bittencourt, 1988). Todos esses fatores conduziram as populações dessa espécie a uma situação de sobre-pesca (Batista, 1998).

Concomitante com o período de decréscimo dos estoques de tambaqui em seu habitat natural, foi iniciada a atividade da aqüicultura, na década de 1980, quando a primeira iniciativa governamental fomentou um programa de desenvolvimento da aqüicultura no Estado do Amazonas. A partir daí, houve expansão da atividade em toda a Região Norte, especialmente da piscicultura do tambaqui, presente em seis dos sete Estados da Região (Roubach *et al.,* 2003), perfazendo 73,5% do pescado produzido no Estado do Amazonas (IBAMA, 2000).

No ano de 2004, a produção aquícola do Estado do Amazonas chegou a 4.775t de pescado. Desse total, 95% compunha-se de tambaqui (4.518,5t) (IBAMA, 2005).

O tambaqui é a espécie mais propícia para a aqüicultura na Amazônia (Freeman, 1995), haja vista a fácil adaptação ao confinamento, aceitação de subprodutos agroindustriais, boa conversão alimentar e disponibilidade de juvenis durante todo o ano (Graef, 1995; Rolim, 1995). Por tanto, há pesquisas para melhor entender os diversos aspectos da criação de tambaquis, tais como a fisiologia da espécie (Roubach *et al.,* 2005; Gomes *et al.,* 2003; Gomes *et al.,* 2002), o desenvolvimento de estruturas de produção eficientes (Ono e Kubitza, 2003; Gomes *et al*., 2006), e aqueles inerentes às necessidades nutricionais. Preconiza-se, atualmente, a utilização de resíduos de componentes regionais, considerados os aspectos qualitativos e quantitativos da alimentação de peixes, como forma de contribuir para a diminuição dos custos de produção em confinamento (Pereira Filho, 2003; Nunes *et al*., 2006).

1.1 Alimentação de tambaquis na natureza

Durante as fases de enchente e cheia, período no qual há uma grande disponibilidade de frutos e sementes (Araujo-Lima e Goulding 1997), o grau de repleção dos estômagos de tambaqui verificado por Oliveira (2003) foi máximo. Neles, frutos e sementes, material vegetal e zooplâncton foram os itens alimentares responsáveis por mais de 90% do ingerido, e na contribuição fracionária de biomassa e carbono, os frutos e sementes participaram com no mínimo 55% nos tecidos dos peixes.

No período de seca, caracterizado por lagos desconectados dos rios, o que representa uma barreira para o acesso dos peixes aos recursos da floresta, foi constatado índice de repleção mínimo. Neste período, o item alimentar mais importante foi o zooplâncton (Araujo-Lima e Goulding 1997). Portanto, o estudo da relação entre a dieta do tambaqui e a floresta de inundação (Goulding, 1980), demonstra que esse peixe tem hábito alimentar onívoro (Goulding e Carvalho, 1982; Silva *et al*, 2000), tendendo a frutívoro (Saint-Paul, 1991).

A análise da composição proximal de 40 espécies de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui revelou valores médios de nutrientes equivalentes a 7,4±3,33% de proteína bruta, 10,94±7,12% de lipídios, 50,34±13,08% de carboidratos, 20,57±11,54% de fibra bruta, 3,3±1,26% de cinzas e energia bruta de 1851,0 kJ/g MS, enquanto para 14 espécies de sementes, foram encontrados

valores médios de 11,2±6,5% para a proteína bruta, 18,5±16,1% de lipídios, 49,2±20,2% de carboidratos, 11,4±9,4% de fibra bruta, 3,0±1,5% de cinza e energia bruta de 20,7±4,1 kJ/g MS (Silva, 1997).

Apesar de a espécie incluir em sua dieta ampla gama de itens para melhor equilíbrio de proteínas, carboidratos, gorduras e vitaminas, o baixo conteúdo de água e o grande tamanho das partículas sugerem que os frutos, mas principalmente as sementes, proporcionam maior ganho de energia por volume de alimento ingerido do que outros itens (Araujo-Lima & Goulding, 1997).

1.2 Ingredientes alternativos em rações para tambaquis

A formulação típica de dietas para animais é completamente variável e dependente do custo dos ingredientes, que é dependente, por sua vez, de sua disponibilidade. Como resultado, as diferenças regionais na formulação de uma dieta podem ser importantes (Bedford, 1995). Partindo desse princípio, e levando em consideração que no modelo de cultivo intensivo de peixes os custos com alimentação podem representar de 60 a 80% dos custos de produção, torna-se interessante a utilização de frutos e sementes como fonte alimentar na piscicultura intensiva do tambaqui na Amazônia (Pereira-Filho, 1995).

Para tanto, trabalhos que envolvam a identificação de frutos e sementes para a avaliação de seus valores energéticos (Roubach, 1991; Waldhoff *et al.*,1996; Silva, 1997), a determinação de seus coeficientes de digestibilidade e suas incorporações em rações experimentais, disponibilizaram resultados que contribuem para diminuir os custos de produção desta espécie (Silva *et al.*, 2003).

Roubach (1991) utilizou diferentes rações peletizadas contendo seringa (*Hevea sp*), embaúba (*Cecropia sp*), arroz integral comercial (*Oryza sativa*) e munguba (*Pseudobombax munguba*). Esta apresentou maior nível protéico, melhor relação energia/proteína e menor nível de umidade, proporcionando melhor crescimento e ganho de peso em alevinos de tambaqui do que os demais ingredientes. Silva (1997) verificou que a substituição do milho (*Zea mays*) por milheto em rações para juvenis de tambaquis foi viável até o nível máximo de 60%. Mori-Pinedo *et al.* (1999) concluíram que a substituição total de milho por farinha de

pupunha (*Bactris gasipaes*) em rações para alevinos de tambaquis não causou prejuízo ao seu desempenho e composição corporal.

A utilização de uma dieta de referência em que 55% de milho foi substituído por farinhas elaboradas a partir dos frutos jauari (*Astrocaryum jauari*) e embaúba, (*Cecropia* sp.) e das sementes de munguba (*Pseudobombax munguba*) e seringa barriguda (*Hevea spruceana*), alterou significativamente os teores dos nutrientes e os coeficientes de digestibilidade de todas as dietas experimentais. A composição das dietas influenciou significativamente no tempo de trânsito do alimento pelo trato gastrointestinal, e as médias dos coeficientes de digestibilidade das fibras, variaram entre 40,2 a 49,6% (Silva *et al.*, 2003). Oishi (2007) utilizou resíduos de castanha da Amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente alternativo em rações extrusadas para juvenis de tambaqui, e concluiu que inclusão de 30% não comprometeu a qualidade da água e o desempenho zootécnico.

Dentre as análises bromatológicas de ingredientes alternativos realizadas pelo Laboratório de Nutrição de Peixes da CPAQ/INPA, destaca-se a da semente do maracujá (*Passiflora edulis*), que apresenta 11,4% de proteína e 43,4% fibra bruta. Esses valores assemelham-se aos relatados por Ferrari *et al.* (2004), após extração de óleo das sementes da referida espécie (15,62% de proteínas e 58,8% de fibras).

O maracujá (*Passiflora edulis*) é originário da América Tropical e é um fruto muito cultivado no Brasil. É rico em vitamina C, cálcio e fósforo. A maior importância econômica do fruto do maracujazeiro está no produto industrializado sob a forma de suco concentrado. No Estado do Amazonas, apresenta ciclo de colheita de 10 meses e pode ser plantado durante o ano todo, o que o inclui entre os principais vegetais cultivados (SMAM., 2008). Os subprodutos do maracujá totalizam entre 65 e 70% do peso do fruto (Oliveira *et al.,* 2002), e a semente representa 26% da sua composição *in natura* (Ferrari *et al*., 2004), cujas fibras são compostas principalmente por celulose, pectina e hemicelulose (Chau e Huang, 2004). Normalmente, estes subprodutos não são aproveitados, e quando o são, servem como suplementação da alimentação animal, como ração para bovinos e aves, ainda que sem informação técnica adequada (Ferrari *et al.,* 2004).

1.3 Fibra na alimentação de peixes

Embora a fibra bruta esteja presente na dieta natural da maioria dos peixes, existem poucos estudos sobre sua função (Lanna *et al.,* 2004). Os benefícios de dietas associadas às fibras geralmente são considerados indiretos (Pavasovic *et al.,* 2006), e afetam a digestibilidade dos nutrientes pelos peixes (Pereira-Filho, 1992; Storebakken *et al.,* 1999).

Segundo Pereira-Filho (1992), os resultados de pesquisas sobre o efeito de diferentes níveis de fibra bruta na dieta de peixes são contraditórios. Como os próprios hábitos alimentares dos peixes variam segundo classes etárias, disponibilidade de alimento e época do ano (Lagler *et al.,* 1962), também há diferença na composição química da fibra, que varia conforme a espécie, a origem, a estrutura e a idade do vegetal (Teixeira, 1995; Reis, 2000; Reis e Rodrigues, 1993).

Foi verificado em trutas (*Salmo gairdneri*), que a utilização de rações com altos teores de fibra bruta resultaram em decréscimo no esvaziamento gástrico em decorrência de menor ingestão e digestibilidade de todos os nutrientes (Hilton *et al.,* 1983). O oposto ocorreu com as trutas arco-íris, para as quais a alta concentração de fibra bruta não interferiu na digestibilidade da fração protéica das dietas, que apresentaram-se entre 84,4% e 90,1% (Ufodike e Matty 1986). Na avaliação de dietas purificadas para *Oreochromis niloticus* com peso médio de 30,65 ± 0,50 g, o aumento do teor de fibra bruta na dieta diminui significativamente o tempo de trânsito gastrintestinal (Lanna *et al*., 2004).

Em experimento realizado com *Oreochromis mossambicus* com peso médio de 2,5 g, alimentadas com níveis de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de celulose, os resultados menos eficientes quanto ao crescimento, conversão alimentar e eficiência protéica foram obtidos com a inclusão dos níveis extremos (0,0% e 10,0%) de celulose na ração (Dioundick e Stom 1990). Silva *et al.* (2003) verificaram que o tambaqui possui habilidade de digerir fibra bruta de determinados frutos e sementes. Esta capacidade deve estar relacionada à produção de celulase pela flora gastrointestinal, campo para futuras investigações.

1.4 Composição das fibras vegetais

Quimicamente, as fibras são constituídas por polissacarídeos não amiláceos (PNAs) interligados entre si ou a proteínas e ligninas (Fincher e Stone, 1986). Os PNAs componentes das paredes celulares dos alimentos de origem vegetal comumente encontrados em rações para peixes (Meurer e Hayashi, 2003), apresentam como constituintes principais a celulose, hemicelulose e pectina (Bijlani, 1985 ; Van Soest, 1994; Silva, 1990).

As pectinas são encontradas em elevadas concentrações nas polpas de frutas cítricas e na beterraba, além da casca da soja e em leguminosas. São carboidratos associados à parede celular, mas não ligados covalentemente às partes lignificadas, conferindo-lhes fácil digestão (Hall, 2001). A lignina é um composto não carboidrato de elevado peso molecular associado à celulose e hemicelulose. Forma-se durante o desenvolvimento da parede celular e altera significativamente a digestibilidade dos vegetais (Norton, 1982), atuando como barreira mecânica à ação de enzimas digestivas (Carré *et al.,*1990).

Enzimas como a celulase, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais. Dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para o desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann *et al.,* 1980).

A hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo, ligado covalentemente à lignina que, por sua vez, não está ligada covalentemente à celulose (Jung, 1989). É abundante nas paredes celulares das plantas (Wilkie e Woo, 1977), e apresenta-se na forma de xilano em cereais e madeiras duras (Timell, 1967).

Contudo, o hábito alimentar do tambaqui de quebrar sementes e frutos (Honda, 1974), expõe os nutrientes encontrados nas camadas mais interiorizadas, sobretudo porque a quantidade total de proteína na parede celular de ingredientes de origem vegetal pode somar de 10% a 30% do total da fibra (Carré *et al.,*1990).

Não obstante a própria evolução adaptativa do tambaqui, os processos de fabricação de rações minimizam o problema pela desobstrução mecânica via trituração de itens alimentares. Os melhores resultados de conversão alimentar e desempenho produtivo têm sido proporcionados por rações extrusadas (Pezzato *et*

al., 2002), haja vista que, dentre outros fatores, a redução do tamanho da fibra facilita a sua digestibilidade (Jerger *et al.*,1982).

1.5 Celulose

A celulose é a macromolécula mais abundante "*in natura*" e é o constituinte principal das paredes celulares de vegetais (MacDougall *et al.,* 1993). Consiste de um polímero linear com ligações β 1-4 de milhares de unidades de glicose e ocorre principalmente na forma cristalizada, organizada como microfibrilas (Theander *et al.*, 1989).

A celulose compõe entre 40 a 60% dos resíduos de plantas (Lynd *et al.*, 2002). Em sementes de oleaginosas, seu teor está entre 40 a 50% (Giger-Reverdin, 1995). A degradação da celulose depende de uma enzima denominada celulase, que hidrolisa as ligações glicosídicas β 1-4, expondo as unidades de glicose para a absorção (Lehninger,1991).

1.6 Celulase

As celulases destacam-se como o mais importante grupo de enzimas necessárias para a degradação de paredes celulares de plantas vasculares (Saha, *et al.*, 2006). Essas enzimas possibilitam a maximização da ação enzimática endógena do animal sobre a hidrólise do amido, lipídio e proteína, aumentando a sua digestibilidade (Oliveira, 2006).

Na natureza existe grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (Robson e Chambliss 1989).

Portanto, pela própria incapacidade de produção endógena de celulase pelos peixes (Lehninger,1991), mas, sabendo que microorganismos produtores desta enzima habitam e coexistem no trato gastrointestinal, o isolamento desses microrganismos tem sido feito em trabalhos ictiológicos (Saha *et al.,* 2006; Bairagi *et al.,* 2002; Saha e Ray, 1998; Lindsay e Harris, 1980).

Os resultados do trabalho de Bairagi *et al*. (2002) indicam que há uma distinta fonte microbiana de enzimas digestivas (amilase, celulase protease, lípase) no trato gastrointestinal de peixes, e que a degradação eficiente de polissacarídeos necessita interações sinérgicas ou cooperativas entre as enzimas responsáveis pela quebra de diferentes ligações. Isso foi verificado por Nelson *et al.* (1999), que, do isolamento de bactérias celulolíticas do intestino de *Panaque* sp, constataram a produção significativa de celulase em consórcio bacteriano, e não com uma linhagem isolada.

A hidrólise enzimática da celulose está dividida em três classes: endoglucanases, que atacam a celulose aleatoriamente e quebram as ligações β-1,4-glicosídicas; exoglucanases, que liberam celobiose e/ou glicose das terminações não reduzidas da celulose; celobiase, que hidroliza a celobiose e outras dextrinas em glicose (Singh e Hayashi, 1995). Contudo, o elevado custo de produção destas enzimas tem dificultado a fabricação industrial de celulase (Narasimha *et al.,* 2006), sendo mais viável economicamente e compatível com a realidade tecnológica nacional a produção massiva das linhagens bacterianas em meios de cultivo baratos e acessíveis.

1.7 Bactérias produtoras de celulase em peixes

A evidenciação de bactérias produtoras de celulase em peixes ainda é pouco reportada quando comparada à presença de bactérias simbióticas produtoras de celulase em animais terrestres (Edmund *et al.,* 1995).

Verificou-se que as espécies *Bacillus circulans, B. pumilus*, e *B. cereus* isoladas do trato gastrointestinal da carpa indiana (*Labeo rohita*), secretam as enzimas protease, amilase e celulase, e que suas inclusões em dietas experimentais aumentaram a taxa de crescimento e sobrevivência em juvenis da espécie (Gosh *et al,* 2002a; b). Na microbiota gastrintestinal da tilápia (*Oreochromis mossambica*) e da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), Saha *et al.* (2006) selecionaram e identificaram *B. megaterium e B. circulans* secretoras de celulase.

As xilanases, principais hemicelulases estudadas, foram encontradas no gênero *Bacillus sp*, além de *Bacteroides sp*, *Ruminococcus sp, Clostridium sp* (Bisaria e Ghose, 1984). Das e Tripathi (1991) reportaram que bactérias produtoras

de celulase formam parte da microbiota intestinal persistente que vive no intestino de carpas, complementando que não foram introduzidas com o alimento. Já a linha de raciocínio de Lindsay e Harris (1980), que igualmente afirmam que há produção de celulase por microrganismos no intestino de peixes, descarta a idéia da manutenção estável desses microrganismos.

Shewan (1961) sugere que as bactérias em peixes são reflexo das populações bacterianas na água. Por outro lado, os melhores resultados da utilização de bactérias benéficas em peixes provêm da inclusão destes microorganismos em suas rações (Gildberg e Mikkelsen, 1998; Saha *et al*. 2006).

Por tanto, a principal estratégia no uso de bactérias benéficas a peixes consiste em isolar de um animal maduro a bactéria intestinal com propriedades favoráveis, e incluí-la em quantidade considerável em animais imaturos da mesma espécie (Gildberg *et al.,* 1997).

2. Referências Bibliográficas

Araujo-Lima, C., and M. Goulding. 1997. So fruitful a fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazons' tambaqui. Columbia University Press, New York.

Bairagi, A.; Sarkar Gosh, K.; Sem, S. K.; Ray, A. K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 109-121.

Beever, D.E. Rumen function In: Forbes, J.M.; France, J. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. New York: Cab. International, 1993. p 187-193.

Bedford, M.R. 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. Animal Feed Science and Technology, 53, 145-155.

Bijlani,R.L. 1985. Dietary fibre: consensus and controversy. In Progress in Food and Nutritions Sciense, 9:343-93.

Bisaria, V. S.; Ghose, T. K. 1984. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Microbiology and Technology, 3: 90-104.

Carré, B.; Delrouet, L.; Leclercq, B. 1990. The digestibility of cell-wall polysaccharides from wheat (bran or whole grain), soybean meal, and while lupin meal in cockrels, muscovy ducks, and rats. Poultry Science, Champaign, v. 69, n. 4, 623-633.

Chau, C.F.; Huang, Y.L. 2004. Characterization of passion fruit seed fibres: a potential fibre source. Food Chemistry, China, v. 85, p. 189-194.

Dioundick, O.B.; Stom, D. Effects of dietary á-cellulose on the juvenile tilapia, Oreochromis mossambicus (Peters). Aquaculture, v.91, n.3/4, p.311-315, 1990.

Edmund, J.; Stellwag, T.;. Smith, D.; Luczkovich, J.J. 1995. Characterization and Ecology of CarboxymethylcellulaseProducingAnaerobic Bacterial Communities Associated with the Intestinal Tract of the Pinfish, Lagodon rhomboids. Applied and Environmental Microbiology vol. 61, no. 2p. 813–816.

Ferrari, R. A.; Colussi, F.; Ayub, R.A. 2004. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá -aproveitamento das sementes. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, SP, 26, (1), 101-102.

Fincher, G. B.; Stone, B. A. 1986. Advances Cereal Science and Technology. St. Paul, 8, 207-295.

Freeman, Z. J. 1995. Amazonian aquatic resources, fishery management and aquaculture development. Senior thesis Woodrow Wilson School. 123 p.

Furukawa, A.; Tsukawara, H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as na index in the study of digestibility of fish feed. Bull. Of the Jap. Soc. Sci. Fisheries, 32: 502-506.

Ghosh, K.; Sen, S. K.; Ray, A. K. 2002a.Growth and survival of rohu, Labeo rohita (Hamilton)spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. Acta Ichthyologica et Piscatoria, v.32, n.1, p.83-92.

Ghosh, K.; Sen, S. K.; Ray, A. K. 2002b. Characterization of bacilli isolated from gut of rohu, Labeo rohita, fingerlings and its significance in digestion. Journal of Applied Aquaculture, v.12, n.3, p.33-42.

Giger-Reverdin S. 1995. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants animal feed science and technology, volume 55, number 3, pp. 295-334 (40).

Gildberg A e Mikkelsen H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (Gadus morhua) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with Vibrio anguillarum. Aquaculture 167: 103–113.

Gildberg A.; Mikkelsen H.; Sandaker and Ringo E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (Gadus morhua). Hydrobiologia 352: 279–285.

Gomes, L.C. ; Chagas, E.D.; Martins Junior, H; Roubach, R ; Ono, E; Lourenço, J.N.P. 2006 . Cage culture of tambaqui (Colossoma macropomum) in a central amazon floodplain lake. Aquaculture, v. 253, n. 1-4, p. 374-384.

Gomes, L.C., Araújo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R.; Urbinati, E.C. 2003 Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 38, 283-290.

Gomes, L.C., Roubach, R.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 2002. Transportation of tambaqui juveniles (Colossoma macropomum) in Amazon: main problems In World Aquaculture Magazine, Vol. 33, pp. 51-53. WAS.

Goulding, M. 1980. The fish and the forest. Explorations in Amazonian Natural History. University of California Press, Los Angeles, 280p.

Goulding, M., Carvalho, M.L. 1982. Life history and management of tambaqui (Colossoma macropomum Characidae). An important Amazonian food fish. Revista Brasileira de Zoologia. v.1, p. 107-133.

Graef, E. W. 1995. As espécies de peixes com potencial para a criação. in: Val, A.L. e Honczark, A. (Eds). Criando peixes na Amazônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus, AM.160pp.

Hall, M.B. 2001. Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows, In: Simpósio internacional em bovines de leite, Lavras: UFLA-FAEPE.

Hilton, J.W.; Atkinson, J.L.; Slinger, S.J. 1983. Effect of increased dietary fiber on the growth of raimbow trout (Salmo gairdinerri). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 40, 81-85.

Honda, E.M.S. 1974. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação do tambaqui, Colossoma bidens. Acta Amazonica, v.4, p.47-53.

Secretaria Municipal de Abastecimento de Manaus - SMAM. http://www.manaus.am.gov.br/portal_skins/pmm/secretarias/secretariaMunicipalDeAbastecimentoMercadosEFeiras/pdf/informacoes_cultura.pdf. Acessado em 24 de outubro de 2008.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA 2005: Estatística da Pesca Brasil: Grandes regiões e Unidades da federação. Brasília, DF.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. 2000. Estatística da Pesca 1998 Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação. Tamandaré: Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste – CEPENE, 96 p.

Jerger, D. E., D. A. Dolenc, and D. P. Chynoweth. 1982. Bioconversion of woody biomass as a renewable source of energy. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12:233-248.

Jung, H. G. Forages lignins and their effects on fiber digestibility. 1989. Agronomy Journal, v.81, p.33-38.

Lagler, K. F.; Bardach, J. E.; Miller, R. R. 1962. Ichthyology. the study of fishes. new york, john willey. 244pp.

Lanna, E. A. T.; Pezzato, E.L.;Cecon, P.R.;FuruyaW. M., Bomfim, M.A.D. 2004. Digestibilidade Aparente e Trânsito Gastrintestinal em Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus), em Função da Fibra Bruta da Dieta. Revista Brasileira de Zootecnia,33, (6), 2186-2192.

Lehninger, A.L. 1991. Princípios de bioquímica. 7ª.ed. São Paulo: Sarvier. 725p.

Lindsay, G. J. H.; Harris, J. E.1980. Carboxymethylcellulase activity in the digestive tract of fish. Journal of Fish Biology, London, 16: (3), 219-233.

Lynd, R. L.; Weimer, P. J.; Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology Microbiology and Molecular Biology Reviews, December. 66 (4) 739.

MacDougall, G.J.; Morrinson, I.M.; Stewart, D. 1993. Plant fibres: chemistry and processing for industrial use. J.SCi. Food Agric., London, 62, (1), 1-20.

Merona, B. and M. M. Bittencourt. 1988. A pesca na Amazônia através dos desembarques no mercado de Manaus: resultados preliminares. Memoria Sociedad de Ciencias Naturales, La Salle XLVIII:433–53.

Meurer, F., Hayashi, C. 2003. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de peixes Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR

Mori-Pinedo, L. A.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M. I. 1999. Substituição do fubá de milho (Zea mays, L.) por farinha de pupunha (Bactris gasipaes, H.B.K)

em rações para alevinos de tambaqui (Colossoma macropomum, CUVIER 1818). Acta Amazônica, v. 29, n. 3, p. 447-453.

Narasimha, G.; Sridevi. A.; Buddolla, V.; Candra, M. Rajasekhar. D.; Reddy B. 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by Aspergillus niger African Journal of Biotechnology. 5: (5), 1684-1744.

Nelson, J.A. Whitmer, M.E. Johnson, E.A. Wubah, D. & Stewart, D.J. 1999. Wood-eating catfishes of the genus Panaque (Eigenmann and Eigenmann): gut microflora and enzyme Activities. Journal of Fish Biology, 54, 1069–1082.

Norton, B.W. 1982. Differences between species in forrage quality. In: Hacker, J.B. (ed) Nutritional limits to animal production from pastures. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, p. 89-110.

Nunes, E. S. S.; Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R. 2006. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília-DF, 41, (1), 139-143.

Oishi, C. 2007. Uso de resíduo da castanha da amazônia (Bertholletia excelsa) como ingrediente alternativo em rações para juvenis de tambaqui (Colossoma macropomum). Dissertação de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 63pp.

Oliveira, G.R. 2006. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (Oreochromis niloticus). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 102pp.

Oliveira, L. F., Nascimento, M. R. F., Borges, S. V. 2002. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa deg.) para produção de doce em calda. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 22, (3),259-262.

Ono, E.; A, Kubitza, F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3a ed. Ono. E.A, Jundaí, São Paulo, 170p.

Pavasovic, A.; Anderson,School of Life Science, Queensland University of Technology, Brisbane, Qld, Australia A. J; Mather, P.B.; Richardson, N.A. 2006. Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail

muscle composition in redclaw crayfish, Cherax quadricarinatus (von Martens) Aquaculture Research, 38 (6), 644-652.

Pereira-Filho, M. 1992. Importância da fibra na nutrição dos peixes. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 7., 1992, Peruíbe. Anais... Peruíbe: ABRAq,. p.1-10.

Pereira-Filho, M. 1995. Alternativas para a alimentação de peixes em cativeiro. In: Val, A.L.; Honczaryk, A. (Eds.) Criando peixes na Amazônia. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. p.75-82.

Petrere, Jr. 1983. Yield per recruit of the tambaqui. Colossoma macropomum Cuvier 1818, in the Amazonas State, Brazil. J. Fish Biol., 22: 133-144.

Pezzato, L.E. 1995. Alimentos convencionais e não convencionais disponíveis para indústria da nutrição de peixes no Brasil. In: Simpósio Internacional sobre Nutrição de Peixes e Crustáceos, 1, 1995, Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. p. 33-52.

Pezzato, L.E., Miranda, E.D.; Furuya, W.M.; Pinto, L.G.Q.; Barros, M.M; Rosa, G.J.M. 2002. Diâmetro do ingrediente e a digestibilidade aparente de rações por duas espécies de peixes tropicais. Acta Scientiarum, Maringá, v. 24, n. 4, p. 901-907.

Reis, R.A.; Rodrigues, L.R.A. 1993. Valor nutritivo de plantas forrageiras. Jaboticabal, 26p.

Reis, S.T. 2000. Valor nutricional de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte. Lavras: UFLA. 99p.

Robson, L.M.; Chambliss, G.H. 1989. Cellulases of bacterial origin. Enzyme and Microbial Technology 11:626-644.

Rolim, P.R. 1995. A infra-estrutura básica para criação de peixes no Amazonas. In: Val, L.A. & Honczark, A. (Eds) Criando peixes na Amazônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus, Amazonas. 160 pp.

Roubach, R. 1991. Uso de frutos e sementes de florestas inundadas na alimentação o tambaqui Colossoma macropomum. Dissertação de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 79pp.

Roubach, R., Correia, E.S., Zaiden, S., Martino, R.C. e Cavalli, R.O. 2003. Aquaculture in Brazil In World Aquaculture, 34, 28-34.

Roubach, R., Gomes, L.C., Fonseca, F.A.L. & Val, A.L. 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier). Aquaculture Research, 36, 1056-1061.

Saha, A. K.; Ray, A. K. 1998. Cellulase activity in rohu fingerlings. Aquaculture.

Saha, S.; Roy, R. N.; Sen, S. K.; Ray, A. K. 2006.Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, Oreochromis mossambica (Peters) and grass carp, Ctenopharyngodon idella (Valenciennes). Aquaculture Research, v.37, p.380-388.

Saint-Paul, U., 1991, The potential for Colossoma culture in Latin America. Infofish International, 2: 49-53.

Shewan, J.M. 1961. The microbiology of sea water fish. In: Fish as Food (ed. G. Borgstrom) Academic Press: London, Vol. 1, pp. 487–560.

Silva, D.J. 1990. Determinação da celulose. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 2.ed. p.20-22.

Silva, J. A. M.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M. I. 2000. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (Colossoma macropomum Cuvier, 1828) natural food. Rev. Bras. de Biologia, 60(4).

Silva, J.A.M. 1997. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1818) nas florestas inundáveis da amazônia central. Tese de Doutorado, INPA/UA, Manaus, AM. 142 p.

Silva, J.A.M.; Filho. M. P., Oliveira-Pereira, M. I. 2003. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, Colossoma macrompum (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal, R. Bras. Zootec., v.32, n.6, p.1815-1824.

Singh A.; Hayashi K.; 1995. Microbial cellulase, protein architecture, molecular properties and biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol. 40: 144.

Storebakken, T.; Kvien, I. S.; Shearer, K. D.; Grisdale-Helland, B.; Helland, S. J. 1999. Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (Salmo salar) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. Aquaculture, 172, 291-299.

Theander, O.; Westerlund, E; Aman, P; Graham, H 1989. Plant cell wall and monogastric diets. Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, v. 23, 5-25.

Thiemann, J.E., Xavier, M.S.S.P., Colen, G. e Guia, M.M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. In Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo. Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185.

Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1:45–70.

Trust T.J.; Sparrow R.A.H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Canadian Journal of Microbiology 20: 1219–1228..

Ufodike, E. B.; Matty, A. J. 1986. Nutrient digestibiliy and growth response of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fed different carbohydrate types. Proceedings Annual Conference of Fisheries. Society, Nigeria, 3: 76-83.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Comstock Publ. Assoc. Ithaca. 476p.

Waldhoff, D.; Saint-Paul, U.; Furch, B. 1996. Value of fruits and seeds from the floodplain forests of Central Amazonia as food resource for fish. Ecotropica, 2,143-153.

Wilkie, K. C. B.; S.L. Woo. 1977. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. Carbohydrate Research. 57:145–162.

CAPÍTULO I - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE EM INTESTINO DE JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).

RESUMO

Populações bacterianas de intestinos de tambaquis procedentes de três locais distintos, tais como viveiro de cultivo, viveiro de pesque-pague e rio Negro, foram quantificadas em ágar carboximetilcelulose pela técnica de diluição seriada e caracterizadas quanto à presença de celulase pela técnica de revelação com vermelho do Congo. As linhagens bacterianas consideradas carboximetilcelulase positivas foram isoladas e submetidas à quantificação das enzimas exo-β-glucanase, endo-β-glucanase, β-glucosidase e xilanase. Os intestinos dos peixes procedentes de viveiro de cultivo apresentaram maior número de UFCs totais ($p<0,05$) e menor número de UFCs celulolíticas ($p<0,05$) que dos peixes procedentes de pesque-pague e do rio Negro. Estes, apresentaram igual número de UFCs totais e celulolíticas ($p<0,05$) entre si. Dos 24 isolados celulolíticos, destacou-se a linhagem bacteriana TR9, que apresentou maiores concentrações de exo-β-glucanase, endo-β-glucanase e xilanase ($p<0,05$). A linhagem foi testada quanto à potencialidade de patogenicidade em alevinos de tambaquis e quanto à viabilidade de inclusão em ração, mostrando-se não patogênica e apta a ser incluída na alimentação.

ABSTRACT

Tambaqui originating from fish farms, fish-and-pay farms and the Negro River were quantified in carboxymethylcellulose agar using the serial dilution technique and the presence of cellulose was determined through the Congo red test. The strains of bacteria considered carboxymethylcellulose positive were isolated and submitted to a quantification of the following enzymes: exo-β-glucanase, endo-β-glucanase, β-glucosidase and xylanase. The intestines of tambaqui originating from fish farms presented a greater number of total UFCs ($p<0.05$) and a lower number of cellulolytic UFCs ($p<0.05$) than those coming from fish-and-pay farms or from the Negro River. These presented an equal number of total and cellulolytic UFCs ($p<0.05$) between themselves. Of the twenty-four isolated cellulolytic bacteria, the TR9 strain of bacteria showed greater concentrations of exo-β-glucanase, endo-β-glucanase and xylanase ($p<0.05$). The pathogenicity potential of the strain was tested in tambaqui alevins in addition to testing the viability of its incorporation into fish feed, revealing itself to be non-pathogenic and apt for such.

1. Introdução

As comunidades bacterianas do trato gastrintestinal de peixes apresentam importante e diversificado potencial de compostos bioativos. O interesse que o assunto gera, verificado pelo volume de publicações acerca do isolamento e da utilização de linhagens bacterianas capazes de produzir compostos úteis para a piscicultura, ratifica tal afirmativa (Saha *et al.*, 2006; Saha e Ray, 1998; Gildberg *et al.*, 1998; Beveridge *et al.*, 1991). Considerando o ponto de vista nutricional, trabalhos que teorizam que linhagens bacterianas causam benefícios para peixes (Machado, 2006; Kennedy *et al.*, 1998), primam por desvendar quais as enzimas produzidas por elas, suas quantificações e as densidades bacterianas que efetivamente resultarão em aumento da absorção do alimento e melhora no ganho de peso (Bogut *et al.*, 1998; Sakata *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*,1992).

A quantificação da concentração bacteriana de tratos gastrintestinais tem sido medida por meio de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), que são as células bacterianas viáveis isoladas do intestino de determinada espécie de peixe e incubadas por tempo pré-determinado em ágar específico, de acordo com metodologia pré-estabelecida. A variação do número de UFCs encontrada em tratos gastrintestinais de peixes ocorre de acordo com a espécie e o ambiente onde vivem, dentre outros fatores. Tomando como exemplo o trato gastrintestinal (tg) de salmões cultivados em água doce*, Oncohynchus keta*, as populações bacterianas atingiram 10^8 UFCs (Trust, 1975); já em *striped bass*, *Morone saxtilis*, as concentrações bacterianas foram menores, variando entre 10^3 e 10^5 UFCs/g de tg. Esta espécie ainda apresentou diferença na concentração bacteriana quando comparados os valores encontrados em intestinos de populações capturadas em águas continentais com os das de águas salgada: aquelas apresentaram entre 100 a 1000 vezes mais bactérias em seus tgs do que estas (MacFarlane *et al*, 1986).

Em trabalho realizado com a microbiota gastrintestinal do tambaqui cultivado na Amazônia, Machado (2006) demonstrou haver número bacteriano na casa de 10^8 UFC/g do trato gastrintestinal. Este autor constatou a existência de fonte microbiana de enzimas digestivas (amilase, lipase e protease), sendo a protease responsável pela atividade enzimática predominante nesses microorganismos.

Quando se trata, porém, de comunidades bacterianas de peixes que produzem enzimas fibrolíticas que aumentam a digestibilidade, maximizando a ação enzimática endógena do animal sobre a hidrólise de amido, lipídio e proteína, as atenções voltam-se para a enzima celulase (Oliveira *et al.*, 2006).

A celulase é um complexo multienzimático formado por endo-β-glucanase, exo-β-glucanase e β-glucosidase, cuja atuação sinérgica atribuíu-se à hidrólise da celulose (Emert *et al.*, 1974; Ryu e Mandels, 1980), liberando os nutrientes do componente vegetal (Cleophas *et al.*, 1995). A endo-β-glucanase degrada a celulose aleatoriamente e quebra as ligações β-1,4-glicosídicas; a exo-β-glucanase libera celobiose e/ou glicose das terminações não reduzidas da celulose, enquanto a β-glucosidase hidroliza a celobiose e outras dextrinas em glicose (Singh e Hayashi, 1995).

Juntamente com as celulases, porém menos retratada do que elas quando o tema está associado à ictiologia, as xilanases constituem-se em enzimas importantes na degradação dos polissacarídeos não-amiláceos (PNAs) (Henn, 2002). Juntas têm sido usadas com sucesso em dietas de monogástricos para hidrólises de polissacarídeos não-amiláceos (Bhat, 2000).

As xilanases são polissacarídeos de peso molecular reduzido, encontrados em associação com celulose e lignina nas células dos vegetais. Elas contribuem na melhora do valor nutricional dos alimentos (Galante *et al.*, 1998), atuando na redução da viscosidade da digesta (Cleophas *et al.*, 1995). Representam aproximadamente 25% da biomassa total de gramíneas e de madeiras. Dentre as enzimas necessárias para a hidrólise de xilano, é de fundamental importância a ação da endo-1β-xilanase (Georis *et al.*, 2000).

Pouco se sabe, porém, sobre a colonização de bactérias produtoras de celulase e xilanase em intestinos de espécies de peixes amazônicos, e ainda nada foi registrado quanto à presença das mesmas em tambaquis, *Colossoma macropomum*. Portanto, o conhecimento mais profundo das populações bacterianas que habitam o trato gastrintestinal desta espécie, principalmente aquelas produtoras das referidas enzimas, poderá ajudar a desvendar os processos de assimilação dos nutrientes em tambaquis, e, consequentemente, facilitará a tomada de decisões visando melhor aproveitamento dos ingredientes de rações.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Isolar bactérias produtoras de enzimas celulolíticas dos intestinos de juvenis de tambaqui.

2.2 Objetivos específicos

Determinar o número bacteriano total e celulolítico dos intestinos de tambaquis procedentes de viveiro, rio e pesque-pague.

Quantificar as enzimas cmcase, avicelase e β-glucosidase das linhagens bacterianas celulolíticas.

Quantificar a enzima xilanase das linhagens bacterianas melhores produtoras de celulase.

Testar a patogenicidade da linhagem bacteriana melhor produtora das enzimas celulase e xilanase.

Avaliar o tempo de vida útil de uma linhagem bacteriana em ração experimental.

3. Material e Métodos

Os tambaquis utilizados para o isolamento das bactérias contidas em seus intestinos procederam de três locais: do viveiro da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura - CPAQ (TV); da floresta inundada, localizada no rio Negro (TR); e de um viveiro de pesque-pague (TP). Foram utilizados cinco exemplares de peixes de cada local, coletados, respectivamente, em 06/03, 08/03 e 11/03/2007.

No primeiro local, foram recolhidos tambaquis juvenis com peso médio de 124g ± 13,3, oriundos de alevinagem, que estavam estocados no viveiro escavado da CPAQ por quatro meses. Neste período, os peixes foram alimentados duas vezes por dia, com ração comercial 32% PB, até a saciedade aparente. A renovação da água do viveiro era efetuada diariamente, em cerca de 5% do volume total. Os peixes foram coletados com rede de arrasto e acondicionados em balde contendo 20 litros da água do ambiente onde viviam.

No segundo, foram recolhidos tambaquis juvenis com peso médio de 133g ± 23,9, adquiridos da pesca local, capturados com rede de espera e acondicionados em caixa térmica de 50 litros. Os peixes foram coletados em floresta inundada, localizada no rio Negro, no Município de Iranduba, AM.

No terceiro, foram recolhidos tambaquis adultos com peso médio de 848g ± 279, adquiridos em fazenda de engorda, quando juvenis, e estocados em viveiro escavado de pesque-pague, localizado no Município de Manaus, por aproximadamente 8 meses. Os tambaquis eram alimentados duas vezes por semana, com ração comercial 32%, até a saciedade aparente. A água do viveiro era suprida de forma constante por nascente. Os peixes foram coletados com rede de arrasto e acondicionados em caixas térmicas contendo 50 litros da água do ambiente onde viviam. Em seguida, foram transportados até os tanques de acondicionamento da CPAQ.

Os tambaquis foram acondicionados separadamente, conforme a procedência, em tanques de alvenaria retangulares, contendo 500 litros de água cada. O acondicionamento foi seguido de lenta aclimatação dos peixes por meio da substituição gradual da água do local onde foram capturados pela água contida nos tanques de acondicionamento. Os tanques eram abastecidos com água de poço artesiano, dotados de renovação de água e aeração constantes. Durante este

período, os tambaquis passaram por fase de jejum de 36 horas, para a limpeza do trato gastrintestinal. Após esse período, os peixes foram transportados em caixas térmicas para o Laboratório de Microbiologia da UFAM, onde foram submetidos à eutanásia em gelo.

Imediatamente após a eutanásia, cada peixe foi pesado em balança digital, conduzido ao fluxo laminar, banhado externamente com solução de iodo 1% (Trust e Sparrow, 1974) e dissecado sobre gelo. Com a cavidade abdominal do peixe aberta, procedeu-se o desnovelamento do intestino e posterior lavagem com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,89%, esterilizada. Somente então foi efetuada a retirada total do intestino, por meio de excisões nas regiões após os cecos pilóricos e antes do ânus.

Cada intestino foi submetido à nova lavagem com solução NaCl 0,89% esterilizada, e, por meio de mixer, foi triturado e homogeneizado em tubo de ensaio, Da massa obtida, foi retirada 1g e armazenada em tubo de ensaio contendo 9 ml de solução de NaCl 0,89%. Entre o processamento de cada peixe, o fluxo laminar foi lavado com solução de álcool 70% e submetido à luz ultravioleta durante 15 minutos.

A partir da porção de intestino contida em solução salina 0,89%, foram promovidas 10 diluições da suspensão bacteriana, na proporção de 1:10 (Beveridge *et al.*, 1991). Uma amostra de 0,1 ml de cada diluição foi pipetada e semeada com alça de Drigalski em placa de petri contendo meio CMC esterilizado. As placas de petri semeadas foram incubadas em estufa eletrônica, em temperatura de 30°C, pelo período de 24 horas.

Cada placa que apresentou crescimento bacteriano foi submetida a banho com 5 ml de solução de vermelho congo, preparado em agarose 0,7% (Teather e Wood, 1982), pelo período de 15 minutos. As colônias que apresentaram formação de halo foram consideradas produtoras de celulase e contadas. Da multiplicação do número de colônias formadas em cada placa, pela sua recíproca diluição, foi determinado o número de colônias por unidade de volume do homogeneizado (Rahmatullah e Beveridge, 1993).

Dentre o número total de colônias formadoras de halo contadas, aquelas que apresentavam diferenças morfológicas macroscópicas foram isoladas e semeadas em placas de petri contendo meio CMC esterilizado, pela técnica de estrias por

esgotamento. Para o procedimento de purificação, as colônias semeadas foram re-isoladas inúmeras vezes e semeadas novamente em meio CMC estéril, por meio da técnica de estrias por esgotamento. As bactérias consideradas celulolíticas foram armazenadas em ependorfes contendo solução de glicerina, sendo preservadas pelo processo de criogenia, a -20°C (Muro e Luchi, 1989). As linhagens encontram-se disponíveis na coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia (UFAM).

As bactérias selecionadas quanto à capacidade de produção de celulase e xilanase foram semeadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas em estufa eletrônica, em temperatura de 30°C, por 24 horas. As suspensões foram depositadas em tubos contendo solução salina 0,89% e ajustadas para 10^7 células/ml.

O volume de 200 µl de cada suspensão bacteriana foi vertido em um erlenmeyer de 50 ml, contendo 5 ml de meio de indução referente à produção de cada enzima desejada (Tabela 1). Os erlenmeyers contendo os meios em pH 7, foram acondicionados em incubador rotativo (shaker) com agitação de 120 rpm e temperatura de 30°C, pelo período de 24 horas.

Tabela 1 - Composição dos meios de indução para as atividades enzimáticas de endo-β-glucanase, exo-β-glucanase, β-glucosidase e xilanase em pH 7.

Reagente (g/l)	Atividade enzimática			
	endo-β-glucanase	exo-β-glucanase	β-glucosidase	xilanase
CMC	10	-	-	-
Avicel	-	10	-	-
Celobiose	-	-	10	-
Xilano	-	-	-	10
KH_2PO_4	4	4	4	4
Na_2HPO_4	4	4	4	4
$MgSO_47H_2O$	0,2	0,2	0,2	0,2
$CaCl_2$	0,001	0,001	0,001	0,001
$FeSO_47H_2O$	0,004	0,004	0,004	0,004
Tryptone	2	2	2	2

Para a separação do extrato bruto enzimático da biomassa bacteriana, foram pipetados, em ependorfers e em triplicata, 2 ml de cada meio de indução com sua respectiva linhagem bacteriana. Os ependorfers foram submetidos à centrifugação a

12000 g, a uma temperatura de 4°C por 15 minutos. Do sobrenadante, foi pipetado 1 ml para novos ependorfers, que foram armazenados em freezer para a posterior realização das quantificações enzimáticas.

Para a atividade da endo-β-glucanase dos extratos enzimáticos brutos das linhagens bacterianas, utilizou-se como substrato a carboximetilcelulose (CMC). A técnica seguiu a metodologia de Carmona (1987), e a produção de açúcares redutores foi medida pelo método do ácido dinitrosalicílico, usando a glicose como padrão (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à liberação de 1μmol de açúcar redutor equivalente à glicose por minuto por mililitro da amostra.

Para a atividade da exo-β-glucanase dos extratos enzimáticos brutos das linhagens bacterianas, utilizou-se como substrato a celulose microcristalina (avicel) (Carmona,1987). A técnica seguiu a metodologia de Carmona (1987), e a produção de açúcares redutores foi medida pelo método do ácido dinitrosalicílico, usando a glicose como padrão (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à liberação de 1μmol de açúcar redutor equivalente à glicose por minuto por mililitro da amostra.

Para a atividade da β-glucosidase dos extratos enzimáticos brutos das linhagens bacterianas, foi utilizado como substrato a celobiose (Carmona,1987). A técnica seguiu a metodologia de Mandels (1974), e a produção de açúcares redutores foi medida pelo método do ácido dinitrosalicílico, usando a glicose como padrão (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à liberação de 1μmol de açúcar redutor equivalente à glicose por minuto por mililitro da amostra.

Para a atividade da xilanase dos extratos enzimáticos brutos das linhagens bacterianas, utilizou-se o xilano de vidoeiro como substrato. A técnica seguiu a metodologia de Bailey *et al*. (1992), e a produção de açúcares redutores pelas atividades xilanolítica foi medida pelo método do ácido dinitrosalicílico, usando a xilose como padrão (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à liberação de 1μmol de açúcar redutor equivalente a xilose por minuto por mililitro da amostra.

A bactéria considerada melhor produtora das enzimas testadas foi empregada em um teste *in vivo* para avaliar sua patogenicidade sobre o tambaqui. Para tanto, placas de petri contendo ágar Müeller-Hinton foram semeadas com a referida bactéria e incubadas em estufa eletrônica, (30℃/24h). As colônias bacterianas crescidas foram raspadas com lâmina de vidro, diluídas e homogeneizadas em frasco contendo 100 ml de solução salina 0,89%, que foi ajustada para a concentração aproximada de 10^{10} células/ml, de acordo com a escala de Mac Farland.

Foram utilizados cinco tanques cônicos, cada um contendo dez litros de água de poço artesiano, e todos foram providos com aeração constante. Alevinos de tambaqui com peso médio de 0,5g, provenientes da CPAQ, foram utilizados no ensaio. Cada tanque cônico recebeu dez peixes, e o período de aclimatação foi de 48h. Em seguida, 10 ml da solução bacteriana foram diluídos em cada tanque cônico, chegando a uma concentração final de 10^7 células/ml. A partir desse momento, os peixes foram monitorados constantemente pelo período de 72 h, para a constatação da mortalidade. Durante o período experimental, não houve renovação de água e os peixes foram privados de alimentação.

A linhagem bacteriana TR9 crescida em ágar Mueller-Hinton a uma temperatura de 27℃/24 horas, foi diluída em solução salina 0,89% e ajustada, de acordo com a escala de Mac Farland, para as concentrações aproximadas de: zero; 10^3; 10^5 e 10^7 células/g de ração.

Os tubos contendo as concentrações bacterianas permaneceram inclinados por 4 horas para decantação bacteriana.

O sobrenadante foi descartado, e o volume de 1ml contendo a biomassa bacteriana foi homogeneizado em óleo de soja. O mesmo procedimento foi realizado para o tratamento controle, porém, sem a presença bacteriana.

Em fluxo laminar, cada solução foi aspergida manualmente em 100g de ração extrusada e esterilizada, a 30% de torta de maracujá. As rações, retratadas respectivamente por R1, R2, R3 e R4, conforme aumento do nível de inclusão bacteriano, foram secas separadamente em estufa microbiológica, durante um período de 24 horas, a 27°C.

Após o período de secagem, três alíquotas de 1g das rações foram submetidas à plaqueamento em ágar Mueller Hinton, para posterior contagem do número de UFC.

Cada ração experimental foi armazenada em pote plástico, identificado e estocado em sala climatizada, a uma temperatura de 22 °C, durante 30 dias, quando o procedimento de contagem de UFC foi repetido.

O crescimento bacteriano nas rações foi analisado pela diferença verificada entre o número de UFC no tempo final e o número de UFC no tempo inicial.

Os valores das repetições referentes às UFCs obtidos para as bactérias celulolíticas e para o número bacteriano total das amostras de intestinos, além dos valores das quantificações enzimáticas adquiridas, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) one way, com nível de significância de 5%, pelo software STATISTICA® (Statisoft, 1995). Quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

4. Resultados

Os valores médios de bactérias celulolíticas e bactérias totais, considerados apenas UFCs/g de intestino de tambaqui contados em ágar CMC, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Média e desvio padrão das UFCs dos intestinos de tambaquis de diferentes procedências.

Procedência	n	Bactérias celulolíticas (UFC/g x 10^5)	Bactérias totais (UFC x 10^7)	Isolados celulolíticos
viveiro	5	$0,03 \pm 0,01$ [a]	$16,9 \pm 5,32$ [a]	3
rio	5	$4,60 \pm 1,44$ [b]	$1,38 \pm 0,76$ [b]	11
pesque e pague	5	$4,80 \pm 1,92$ [b]	$3,53 \pm 1,82$ [b]	10

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores médios, mínimo e máximo de UFCs para as bactérias celulolíticas isoladas dos intestinos de tambaquis variaram entre 0,03 e 4,80 x 10^5 UFC/g, e a média apresentada foi 3,14 x 10^5 UFC/g.

Os intestinos dos peixes procedentes de viveiro apresentaram número médio de bactérias celulolíticas estatisticamente inferior ao número médio de bactérias registrado nos intestinos dos animais procedentes do rio e de pesque - pague; estes, por sua vez, não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Os valores médios, mínimo e máximo de UFCs para as bactérias totais isoladas dos intestinos de tambaquis variaram entre 3,53 e 16,9 x 10^7 UFC/g, e a média apresentada foi de 7,27 x 10^7 UFC/g. Os intestinos dos peixes procedentes de viveiro apresentaram número médio de bactérias totais estatisticamente superior ao número médio de bactérias registrados nos intestinos dos peixes do rio e de pesque-pague; estes, por sua vez, não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Foram isoladas 24 colônias consideradas diferentes morfologicamente. Os tambaquis procedentes de viveiro, rio e pesque-pague perfizeram respectivamente 3, 11 e 10 isolados.

As 24 colônias isoladas foram submetidas à quantificação da atividade enzimática de endo-β-glucanase (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios das atividades de endo-β-glucanase dos isolados bacterianos.

Bactéria	Atividade enzimática (U/ml)	Diferença estatística (p< 0,05)*
TP6	0,010	----------
TR11	0,010	----------
TP4	0,010	----------
TP3	0,011	----------
TR5	0,011	----------
TR6	0,011	----------
TV3	0,012	----------
TP1	0,012	----------
TR7	0,012	----------
TP7	0,012	----------
TR8	0,012	----------
TR10	0,013	----------
TV1	0,013	----------
TP8	0,013	----------
TP9	0,015	--------
TP10	0,016	--------
TR9	0,039	--------

* Tracejados sobrepostos não representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey.

As atividades de endo-β-glucanase obtidas das linhagens bacterianas, nas condições experimentais em que foram submetidas, apresentaram valores médios entre 0,010 e 0,039 U/ml. Este valor corresponde à linhagem TR9, diferente estatisticamente das demais linhagens.

As bactérias TV2, TR1, TR2, TR3, TR4, TP2 e TP5 não apresentaram atividade enzimática de endo-β-glucanase, portanto, não foram inseridas na Tabela 3. Os 24 isolados foram submetidos à quantificação da atividade enzimática de exo-β-glucanase (Tabela 4

Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios das atividades de exo-β-glucanase dos isolados bacterianos.

Bactéria	Atividade enzimática (U/ml)	Diferença estatística (p< 0,05)*
TP3	0,010	--------
TR1	0,011	----------
TP4	0,012	----------
TP2	0,012	----------
TP8	0,021	----------
TR7	0,024	----------
TR6	0,026	----------
TV1	0,028	----------
TR11	0,038	----------
TV2	0,040	----------
TR4	0,044	--------
TP10	0,048	--------
TR9	0,082	--------

*Tracejados sobrepostas não representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey.

As atividades de exo-β-glucanase obtidas das linhagens bacterianas, sob as condições experimentais a que foram submetidas, apresentaram valores médios entre 0,010 e 0,082 U/ml. Este valor corresponde à linhagem TR9, diferente estatisticamente das demais linhagens. As bactérias TV3, TR2, TR3, TR5, TR8, TR10, TP1, TP5, TP6, TP7 e TP9 não apresentaram atividade enzimática de exo-β-glucanase, portanto não foram inseridas na Tabela 4.

Os 24 isolados foram submetidos à quantificação da atividade enzimática da β-glucosidase (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios das atividades de β-glicosidase dos isolados bacterianos.

Bactéria	Atividade enzimática (U/ml)
TP2	0,010
TR10	0,010
TP8	0,013
TP3	0,014
TP9	0,014
TP6	0,014
TR4	0,015
TR11	0,015
TV1	0,015
TP1	0,015
TR7	0,016
TP10	0,016
TV2	0,017
TR9	0,017
TR1	0,018
TP7	0,019
TR8	0,019
TV3	0,019
TP4	0,020
TR5	0,021
TR6	0,021

As atividades da β-glicosidase obtidas das linhagens bacterianas, sob as condições experimentais a que foram submetidas, apresentaram valores médios entre 0,010 e 0,021 U/ml ($p < 0,05$). As bactérias TR2, TR3, e TP5 não apresentaram atividade enzimática de β-glucosidase, portanto não foram inseridas na Tabela 5. As linhagens bacterianas TR9, TR10, TP8 e TV1 foram selecionadas para a quantificação da enzima xilanase (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios das atividades de xilanase dos isolados bacterianos.

Bactéria	Atividade enzimática (U/ml)	Diferença estatística (p< 0,05)*
TV1	0,006	--------
TP10	0,008	--------
TP8	0,011	--------
TR9	0,394	--------

*Tracejados sobrepostos não representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey.

As atividades da xilanase obtidas das linhagens bacterianas testadas apresentaram valores médios entre 0,06 e 0,394 U/ml. Este valor corresponde a linhagem TR9, diferente estatisticamente dos valores das demais linhagens.

A linhagem bacteriana TR9 utilizada para o teste de patogenicidade não causou mortalidade nos peixes ($p<0,05$) no período pré-estipulado de 96 horas. Igualmente, não foi verificada a presença de peixes moribundos ou com sintomas patológicos decorrentes de ação bacteriana.

O número de UFCs referentes à linhagem bacteriana TR9 contadas na ração teste está representado na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores médios das UFCs contadas nas rações.

	UFC/g de ração		
Tratamento	Tempo zero	Tempo 30	Tempo 30 –Tempo 0
R1	0	0	0
R2	$2,4 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$
R3	$1,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$
R4	$1,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$

Os peixes dos tratamentos R2, R3 e R4 revelaram incremento do número médio de UFCs no decorrer do experimento, verificado por meio da diferença obtida entre as concentrações registradas em T0 e T30. O número médio de UFCs registrado nos tratamentos T2, T3 e T4 permaneceu nas potências de 10^3, 10^5 e 10^7 no decorrer do período experimental.

5. Discussão

As bactérias presentes em ambientes aquáticos e o hábito alimentar dos peixes podem influenciar a composição de suas microbiotas gastrointestinais (Smith, 1989; Cahill, 1990). O número de bactérias totais verificado neste experimento aproximou-se daqueles encontrados em TGs de tambaquis, de 1 a 2,43 x 10^8 UFC/g (Machado, 2006). Como o meio CMC não é selecionador de bactérias celulolíticas, mas caracterizador das mesmas, foi utilizado como parâmetro para a quantificação de bactérias totais dos TGs dos tambaquis dos diferentes tratamentos.

Em ambientes controlados, como os viveiros de cultivo, práticas de manejo como desinfecção e limpeza antes do povoamento e, elevações súbitas de nutrientes devido à alimentação exógena, geralmente não providenciam ambiente apropriado ao estabelecimento de comunidades microbianas estáveis (Skjermo, 1999), entretanto existe a possibilidade de florações bacterianas. Esta floração pode ser ingerida pelos peixes em elevadas taxas por meio de alimento ou água (Verschuere *et al.*, 2000), tornando pouco provável sua ausência como componente de suas dietas (Bairagi *et al.*, 2002).

Tal fato explica a elevada concentração bacteriana encontrada nos intestinos dos tambaquis procedentes de viveiro, já que o fluxo de água passa pelo trato digestivo dos peixes e as bactérias são organismos simples e de rápida multiplicação quando há presença de elevadas quantidades de compostos orgânicos na coluna da água (Sugita *et al.*, 1998; Alberts *et al.*, 2002).

O número médio de bactérias celulolíticas isoladas nos intestinos dos peixes (7,27 x 10^5 UFC/g) pode ser considerado próximo ao dos peixes Labeo rohita e Channa punctatus, que atingiram, respectivamente, 3,2 e 2,8 x 10^5 UFCs/g (Kar e Ghosh, 2008). Dentre nove espécies de peixes adultos, com diferentes hábitos alimentares, estudados por Bairagi *et al.* (2002), a *Catla catla* (zooplanctófago), a *Cirrihinus mrigala* (detritívoro), a *Oreochromis mossambica* (onívoro) e a *Ctenopharyngodon idella* (herbívoro) apresentaram, na sequência, 0,3; 0,5; 5 e 7 x 10^3 UFCs, valores que abrangem 3 x 10^3 (ou 0,03 x 10^5), encontrados nos peixes procedentes de viveiro. Dos diversos compostos orgânicos, a celulose é o biopolímero mais abundante na natureza (MacDougall *et al.*, 1993). Dessa forma, espera-se que a água apresente celulose como substrato. Contudo, poderá

apresentar outros substratos, mais acessíveis para a assimilação bacteriana (Kulkarni *et al.*, 1999), como proteínas, peptídeos e álcoois (Dionizio *et al.*, 2002).

Uma das conseqüências seria a escassa quantidade de bactérias celulolíticas verificada nos intestinos dos tambaquis procedentes de viveiro, já que florações bacterianas são processos comumente constatados em viveiros de água doce (Azevedo, 1998). Por outro lado, bactérias celulolíticas poderiam estar em abundância no ambiente, mas talvez não sobrevivam à passagem pelo trato gastrintestinal, ou seriam desprovidas de capacidade de aderência na mucosa intestinal.

Os ambientes nos quais as coletas foram efetuadas não foram monitorados constantemente. Porém, pelas características dos biótopos onde os peixes procedentes do pesque - pague e do rio Negro foram coletados, ou seja, pela própria possibilidade de explorar outros itens alimentares que não somente a ração, como detritos vegetais, insetos, frutos e sementes, pode ter resultado em quantidades significativamente mais elevadas de populações de bactérias celulolíticas do que as dos intestinos daqueles tambaquis procedentes de viveiro.

Dos 24 isolados bacterianos selecionadas quanto à presença de halo, 70,8% produziram endo-β-glucanase, 50,4% exo-β-glucanase e 87,5% β-glucosidase. Por tanto, a metodologia pode ser considerada apropriada no que tange à pré-seleção de bactérias celulolíticas, visto que o método aplicado é usado quando se deseja submeter grande quantidade de linhagens à atividade celulolítica (Magnelli *et al.*, 1997).

Exceção ocorreu com as linhagens bacterianas TR2, TR3 e TP5, que apresentaram halo, mas não apresentaram atividade celulolítica. A visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir no corante proporcionando resultados falso-positivos, ou ainda, provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (Neirotti & Azevedo 1988).

Investigações acerca da atividade da celulase em peixes são escassas e conflitantes (Saha e Ray, 1998), sobretudo quando a ampla gama de métodos usados para determinar sua atividade e as inúmeras maneiras de expressá-la tornam difícil a comparação quantitativa entre dados de diferentes procedências

(Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004; Lai *et al.*, 2006). É conhecido, porém, que a ação cooperativa entre as enzimas celulolíticas é essencial para a hidrólise enzimática de um processo (Andersen *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 1993). Por consequência, a linhagem bacteriana TR9 foi considerada a melhor produtora de endo-β-glucanase e exo-β-glucanase, além da xilanase.

O xilano, como maior componente hemicelulósico de madeira e de gramíneas, representa 25% da biomassa total e está associado com a celulose e a lignina das mesmas. Trabalhos relacionados a esta enzima estão voltados para a nutrição de suínos, onde foram verificados melhor digestibilidade da fibra bruta, matéria seca e do extrato etéreo (Tapingkae *et al.*, 2008), importante na digestibilidade de material lignocelulósico para os animais (Georis *et al.*, 2000).

A prática de inocular um microorganismo para benefício de seu hospedeiro depende de seu efeito benéfico (Chukeatirote, 2003). Determinado microorganismo testado *in vitro* quanto às características de anseio do pesquisador pode, às vezes, apresentar interações patogênicas ou tóxicas com seu hospedeiro, o que não foi verificado no teste de patogenicidade da linhagem bacteriana TR9 em questão.

A presença de células viáveis nas rações experimentais, decorridos 30 dias de armazenamento das mesmas, demonstra a viabilidade de inclusão da linhagem TR9 na ração. O oposto ocorreu em dois gêneros de Bacillus e Citrobacter freundii, que diminuíram suas concentrações em ração comercial no decorrer de cinco semanas (Aly *et al.*, 2008). Importante, neste caso, é ressaltar a manutenção das UFCs nas potências pré-estipuladas, fato importante para que possa ser evidenciada a concentração bacteriana que resulte em benefício para os peixes.

Entretanto, o crescimento da linhagem TR9 verificado no período sugere a sua inoculação em prazos menores do que 30 dias, a fim de minimizar a provável perda de nutrientes da ração pela própria assimilação bacteriana, ou o provável acréscimo de nutrientes pelo aumento da biomassa bacteriana nas rações.

6. Conclusão

O tambaqui, *Colossoma macropomum,* apresenta bactérias produtoras de celulase em seu intestino;

A linhagem bacteriana TR9 apresentou maiores valores de endo-β-glucanase, exo-β-glucanase e xilanase.

7. Referências Bibliográficas

Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A. 1999. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Artes Médicas, Porto Alegre, 757 p.

Aly, S.M.; Azza, M.; George, J.; Mohamed, F. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture, 277. 1-6.

Andersen N.A.C.; Johansen, K.S.B.; Michelsen, M.C., Stenby, E.H.C., Kristian B.R.M.; Krogh, B; Olsson, L.A. 2008. Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on avicel. Enzyme and Microbial Technology 42: 362–370

Azevedo, S. M. F. O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. Medicina On - Line, (1):3:1-19.

Bailey, M.J; Biely, P.; Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, J. Biotechnol, 23: 257–270.

Bairagi, A.; Ghosh, K.; Sen, S.K.; Ray, A.K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International, 10: 109- 121.

Beveridge M.C.M.; Sikdar P.K.; Frerichs G.N.; Millar S. 1991. The ingestion of bacteria in suspension by the common carp Cyprinus carpio L. Journal of Fish Biology, 39: 825–831.

Bhat, 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances,18: 355-383.

Bogut, I.; Milakovic, Z.; Bukvic, Z; Brkic, S.; Zimmer, R. 1998. Influence of probiotic (Streptococcus faecium M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). Czech Journal of Animal Science, 43: 231–235.

Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. Microbial Ecology, 19: 21-41.

Carmona, E.C. 1987. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola sp*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Chukeatirote, E. 2003. Potential use of probiotics. Songklanakarin. Journal of Science Technology, 25: 275-282.

Cleophas, G. M. L.; Van Hartingsveldt, W.; Somers, W. A. C. 1995. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. World Poultry Science Journal, (11): 4, 12-15.

Danulat, E. 1986. The effects of various diets on chitinase and β- glucosidase activities and the condition of cod, *Gadus morhua* (L.). Journal of Fish Biology (28): 2, 191 – 197.

Das, K.M.; Tripathi, S.D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp,

Dionizio, M. A.; Bertechini, A. G.; Kato, R. K.; Teixeira, A. S. 2002. Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – desempenho e rendimento de carcaça. Ciência Agrotécnica, Lavras, Edição Especial, p. 1580-1587.

Galante Y.M.; De Conti A.; Monteverdi, R. 1998. Application of Trichoderma enzymes in food and feed industries. In: Harman, G. F; Kubicek, C. P. Trichoderma & Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & Francis, p. 327-342.

Georis, J. Giannotta, F.; De Buyl, E.; Granier, B.; Frere, J-M. 2000. Purification and properties of three endo-β-1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. Strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and microbia. technology*, 26, 178-186.

Gilbert, H.J.; Hazlewood, G. 1993. Bacterial cellulases and xilanase. Journal of General. Microbiology, 139: 187- 194,.

Heck, J.X; Plinho F. H.; M A.Z. Ayub M.A.Z. 2002. Cellulase and xylanase production by isolated amazon bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state sultivation. Brazilian Journal of Microbiology, 33:213-218

Henn, J. D. 2002. Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Kar N.; Ghosh K. 2008. Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch) / Turkish Journal Fisheries and Aquatic Sciences. 8: 115-120.

Kennedy S.B.; Tucker J.W.; Neidic C.L.; Vermeer G.K.; Cooper V.R.; Jarrell J.L.; Sennett D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). Bulletin of Marine Science, 62: 573–588.

Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. 1999. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. Federation of European Microbiological Societies, 23: 411-456.

Lai, E.T., Pullammanappallil, P., Clarke, W. P. 2006. Quantification of cellulase activity using cellulose-azure. Talanta 69, 68–72.

MacDougall, G.J.; Morrinson, I.M.; Stewart, D. 1993. Plant fibres: chemistry and processing for industrial use. Journal of Science Food Agricultural. London, 62, (1),1-20.

MacFarlane, R. D.; McLaughlin, J. J.; Bullock, *G.* L. 1986. Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal environments, Journal of Wildlife Disease, 22: 344–348.

Machado, M. L. 2006. Potencialidade do uso de bactérias secretoras de enzimas digestivas no cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado – INPA/UFAM, Manaus, pp 74.

Magnelli, P. E.; Martínez, A.; Mércuri, O. A. 1997. Simple method for determining cellulolytic activity in fungi. Revista Argentina de Microbiologia, 29 (4):210-214.

Mandels, M. 1974. Production and application of cellulase. Massachusetts: Laboratory Procedures, Army Natick Laboratories, pp 22 .

Miller, G.H. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytic Chemistry, Amsterdan, 31: 426- 428.

Muro, M. A. & Luchi, M. R. 1989. Métodos de preservação. In: Muro, M. A. & Luchi, M. R. (Eds.) Preservação de microorganismos. Campinas: Publicação FTPT, Cap.I, p. 8-12.

Oliveira, G.R. 2006. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 102 pp.

Rahmatullah S.M. ; Beveridge M.C.M. 1993. Ingestion of bacteria in suspension by indian major carps (*Catla catla*, *Labeo rohita*) and chinese carps (*Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis*). Hydrobiologia, 264: 79–84.

Ruegger, M. J. S.; Tauk-Tornisielo, S. M. 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 27 (2): 205-211.

Saha, S., Roy, R.N., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (P) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (V). Aquaculture Research, 37: 380-388.

Saha, S.; Ray A.K. 1998. Cellulase activity in rohu fingerlings. Aquaculture International, 6: 281–291.

Sakata, T., Okabayas, J., Kakimoto, D. 1980. Variations in the intestinal microflora of Tilapia reared in fresh and seawater. Bulletin of Japanese. Society Science Fisheries, 46:313–317.

Seidle, H. F., Huber, R.E. 2001. Characterization of wild type and substituted *B*-glucosidases from aspergillus niger. University of Calgary, Canada, p.387-400.

Singh, A.; Hayashi, K. 1995. Microbial cellulase, protein architecture, molecular properties and biosynthesis. Advanced. Applied. Microbiology. 40: 144 -148.

Skjermo, J.; Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture, 177:333–343.

Smith, L.S. 1989. Digestive functions in teleost fishes. In: J.E. Halver (Ed.), Fish Nutrition, 2nd Ed. Academic Press, San Diego: 331-421.

Sugita, H.; Hirose, Y.; Matsuo, N.; Deguchi, Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus sp*. Strain NM 12, an intestinal bacterium of japanese coastal fish. Aquaculture,165: 269-280.

Tapingkae, M.; Yachai, W.; Visessanguan, P.; Pongtanya, P.; . Pongpiachan, P.; 2008.Influence of crude xylanase from *Aspergillus niger* FAS128 on the in vitro digestibility and production performance of piglets . Animal Feed Science and Technology , 140 , (1 – 2), 125 – 138.

Teather, R.M.; Wood, P.J. 1982. Use of Congo-red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied Environmental Microbiology, 43: 777-780.

Trust T.J. 1975. Facultative anaerobic bacteria in the digestive tract of chum salmon *(Oncohynchus keta)* maintained in fresh water under defined culture conditions. Applied Microbiology, 29: 663-668

Trust T.J. e Sparrow R.A.H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Canadian Journal of Microbiology, 20: 1219–1228.

Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64, (4): 655-671.

Watanabe, K.; Sezaki, K.; Yazawa, K.; Hino, A. 1992. Nutritive fortification of the rotifer *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid-producing bacteria. Nippon Suisan Gakkaishi. 58: 271-276.

CAPÍTULO II - DIGESTIBILIDADE APARENTE, POR JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*), DE RAÇÕES EXTRUSADAS CONTENDO NÍVEIS CRESCENTES DE TORTA DE SEMENTE DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*).

RESUMO

Rações extrusadas contendo torta de semente de maracujá (TSM) em níveis crescentes, sendo eles 0, 10, 20 e 30%, foram fornecidas para juvenis de tambaqui e avaliadas por meio do Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, e constou de quatro tratamentos com três repetições cada. Para tanto, foram utilizados tanques cilíndrico-cônicos com volume útil de 80 L de água, providos de terminal para a coleta de fezes. Os resultados demonstraram ser viável tecnicamente a inclusão de 10% de TSM em ração extrusada para juvenis de tambaqui.

ABSTRACT

Extruded feed containing increasing levels of passion fruit seed meal (PFSM) at, 10, 20 and 30%, was given to juvenile tambaqui and evaluated by means of the Apparent Digestibility Coefficient (ADC). The experiment was carried out in a completely randomized design and consisted of four treatments with three repetitions each. Cylindrical cone-bottom tanks, each with a useful volume of 80 L, were used full of water and provided with a terminal for collecting feces. The results demonstrated that incorporating a dose of 10% passion fruit seed meal into extruded feed for juvenile tambaqui is technically viable.

1. Introdução

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1801), é um caraciforme que pode pesar 30 Kg e medir 90 cm de comprimento (Goulding, 1980). Foi a espécie retratada por Freeman (1995) como a mais propícia para a aqüicultura na Amazônia, e a que possui elevado valor comercial e grande importância sócio-econômica na América Latina (Silva *et al.*, 2007).

A fácil adaptação ao cativeiro, a aceitação de subprodutos agroindustriais, a boa conversão alimentar e a disponibilidade de juvenis durante todo o ano são características favoráveis para sua utilização na atividade piscícola (Graef, 1995; Rolim, 1995). Entretanto, a alimentação de tambaquis representa o maior percentual dos custos operacionais, entre 60 e 80% das despesas de produção em piscicultura intensiva (Silva *et al.,* 2007; Pereira-Filho, 1995).

A solução na redução dos custos de produção em cultivo de tambaqui tem sido investigada por meio da utilização de ingredientes vegetais em rações para estes peixes (Oishi, 2007; Silva *et al.,* 2003). Mesmo considerando que estas fontes protéicas sejam de qualidade inferior às de origem animal, por apresentarem menor digestibilidade, deficiências em aminoácidos, além de alguns fatores antinutricionais (FAN), são uma opção econômica para a formulação de dietas (Pezzato, 1995).

Portanto, qualquer pesquisa que vise investigar se determinado insumo vegetal é viável quanto sua inclusão em ração para peixes passa pela análise do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA), que é importante parâmetro de avaliação do valor nutricional de uma ração e de sua assimilação pelo animal (Pezzato *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; NRC, 1993; Cho, 1987). Nos últimos anos, vem sendo testada a viabilidade técnica da inclusão de resíduos vegetais provenientes da agroindústria de processamento de produtos regionais em rações para peixes amazônicos (Oishi, 2007; Silva, 1997; Roubach, 1991).

Embora a fibra bruta esteja presente na dieta natural da maioria dos peixes, existem poucos estudos sobre sua função (Lanna *et al.*, 2004). Os benefícios associados ao uso de fibras em dietas geralmente são considerados indiretos, entretanto, afetam a digestibilidade dos nutrientes das dietas de peixes (Pereira Filho, 1992; Storebakken *et al.,* 1999).

Segundo Pereira-Filho (1992), os resultados de pesquisas sobre o efeito de diferentes níveis de fibra bruta na dieta de peixes são contraditórios. Os hábitos alimentares dos peixes variam segundo classes etárias, disponibilidade de alimento e época do ano (Lagler *et al.,* 1962), existindo diferenças na composição química da fibra conforme a espécie, a origem, a estrutura e a idade do vegetal (Reis, 2000; Reis e Rodrigues, 1993).

A utilização de elevados teores de fibra bruta na dieta causa decréscimo na taxa de esvaziamento gástrico, decorrente de menor ingestão e digestibilidade dos nutrientes (Hilton *et al*., 1983). A ausência de fibra em rações para peixes causa a putrefação protéica, limitando a sua eficiência, alterando o crescimento e a conversão alimentar dos peixes (Pereira Filho, 1992; Dioundick & Stom 1990).

O National Research Concil - NRC (1993) recomenda que as rações compostas por ingredientes de origem vegetal apresentem entre 3,0 a 5,0% de fibra bruta. Para tambaquis, porém, a taxa de inclusão de fibra bruta em rações experimentais tem variado entre 1,89% até 21,2%, conforme o ingrediente utilizado (Vidal Jr. *et al.,* 2004; Silva *et al.,* 2003).

Dentre vários subprodutos e resíduos com potencial de inclusão em rações para peixes amazônicos, destaca-se a torta da semente do maracujá (*Passiflora edulis*). O maracujá é nativo do Brasil e seus subprodutos correspondem a cerca de 70% do peso do fruto (Oliveira *et al.,* 2002). A semente representa 26% da sua composição *in natura* (Ferrari *et al.,* 2004), cujas concentrações de proteína e lipídeos equivalem a 8,25 e 24,5%.

As fibras das sementes são compostas principalmente por celulose (39,34%) e hemicelulose (10,25%), mas também apresentam lignina (9,45%). Os valores expressos como fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) equivalem respectivamente a 59,12% e 49,04% (Chau e Huang, 2004; Júnior *et al.,* 2006). Há necessidade de avaliar quais são os constituintes da fibra e qual a sua influência sobre a digestão (Hayashi *et al.,* 2000).

O método analítico da fibra bruta ignora as frações lignina e hemicelulose, solubilizadas pelo tratamento da amostra com soluções alcalina e ácida, e não satisfaz a exigência de recuperação de componentes indigeríveis da fibra dietética. Por tanto, gradativamente, o método de fibra em detergente neutra (FDN)

desenvolvido por Van Soest e Wine (1967) e aprimorado por Mertens (1996), vem sendo utilizado (Berchielli *et al.,* 2006).

A parede celular, comumente chamada de fibra, compreende a parte do alimento que oferece resistência à digestão (Van Soest, 1994). Em monogástricos, sua digestão é efetuada por microorganismos no intestino grosso e ceco, e estudos priorizam o tratamento da fibra pela adição de enzimas, além da suplementação probiótica em rações (Lassiter e Eduards, 1982; Penz, 1996; Fireman *et al.,* 1998;). Os peixes são desprovidos da capacidade de digerir estas fibras (Ray *et al.,* 2007; Lehninger,1991), e é neste contexto que a determinação do nível de inclusão mais adequado da TSM, que pode ser determinado por meio do coeficiente de digestibilidade aparente dos ingredientes, particularmente dos constituintes fibrosos, permitirá um melhor entendimento de suas características e de sua importância para o balanceamento de dietas.

1. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar o coeficiente de digestibilidade aparente de rações extrusadas contendo níveis crescentes de torta de semente de maracujá, *Passiflora edulis*, em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*;

2.2 Objetivos Específicos

Quantificar os teores de FDN, lignina, celulose e hemicelulose de rações com níveis crescentes de torta de semente de maracujá.

Avaliar a influência de componentes fibrosos de rações com níveis crescentes de torta de semente de maracujá na digestibilidade aparente para juvenis de tambaqui.

Determinar a digestibilidade da celulose e hemicelulose em função da concentração de lignina das rações experimentais.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPAQ-INPA).

Mil alevinos de tambaquis com peso médio de 0,5g, procedentes da fazenda comercial Santo Antônio, Manaus AM, foram estocados em viveiro escavado de 24m2. Os alevinos foram alimentados com ração comercial 40% PB, três vezes ao dia, com taxa de 5% da biomassa total. Diariamente, foi efetuada a troca parcial da água, correspondente a 5% do volume total.

Após o período de crescimento, os peixes foram realocados para um sistema de aclimatação, localizado no galpão de experimentos. O transporte dos peixes foi realizado em baldes contendo solução salina 5g/l. A liberação dos peixes ocorreu após a mistura lenta e gradativa da água dos baldes com a água do poço que supre o sistema de aclimatação. Este sistema consiste em 4 tanques de concreto retangulares, com volume total de 500 l cada, providos de renovação de água (5% do volume total/dia) e aeração constantes. Cada tanque recebeu 250 peixes que foram alimentados duas vezes ao dia, com ração comercial a 32% PB, durante uma semana. Os restos alimentares e fezes foram sifonados após cada período alimentar.

Foram utilizados como ingredientes de teste, os resíduos do despolpamento do maracujá (Passiflora edulis), que consistem em sementes semi desengorduradas por prensa mecânica (torta), secas ao sol e trituradas em moinho com matriz de seleção inferior a 1 mm. Foram adquiridos 100 Kg de semente de maracujá provenientes de fábrica de despolpamento de frutos amazônicos, sob o nome CUPUAMA, M.E., localizada no Município do Careiro da Várzea, AM. Uma alíquota das sementes foi separada para análise bromatológica. O resíduo foi armazenado em sacos de ráfia, em sala climatizada a 22°C, até a fabricação das rações.

No Laboratório de Nutrição de Peixes da CPAQ, foram efetuadas análises da composição centesimal de amostras dos resíduos, do ingrediente das rações experimentais e das fezes coletadas de cada tratamento, seguindo a metodologia da AOAC.(1995) e em triplicata. O teor de umidade da TSM e dos demais ingredientes e rações foi determinado por secagem em estufa até o peso constante a 105 ^{o}C. O

teor de proteína bruta presente nas amostras foi calculado por meio da determinação do teor de nitrogênio, pelo método micro-Kjeldahl, e multiplicação deste valor pelo fator 6,25. O conteúdo de Extrato Etéreo foi determinado pelo método da extração contínua, com a utilização do solvente éter de petróleo em extrator intermitente (Soxhlet). Para determinação do conteúdo de Cinzas, alíquotas das amostras foram incineradas em mufla a uma temperatura de 550°C, e o resíduo remanescente representou a concentração total de cinza. As estimativas de parede celular total foram obtidas pela análise de fibra em detergente neutro (FDN), conforme metodologia descrita em Van Soest & Wine (1967). As estimativas da fibra em detergente ácido (FDA, hemicelulose, celulose) e lignina bruta (lignina e minerais) seguiram a metodologia descrita em Van Soest & Wine (1967). O teor de cada componente foi obtido da seguinte forma:

Hemicelulose = FDN-FDA;

Celulose = FDA- lignina bruta;

Lignina = lignina bruta - cinzas da lignina bruta.

Os Carboidratos não estruturais (CNE) foram obtidos por meio da diferença entre carboidratos totais (CHO) e FDN. Os CHOs foram calculados por intermédio da equação 100 – (%PB + %EE + %Cinzas), segundo Sniffen et al.(1992). A Energia Bruta foi determinada para todas as amostras de ração e fezes, pelos valores calculados de energia protéica, extrato etéreo e carboidratos, seguindo NRC (1993).

As rações foram formuladas a partir dos resultados da análise químico-bromatológica dos ingredientes utilizados (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**).

Tabela 8 - Análise químico-bromatológica dos ingredientes das rações (g/100g MS).

Ingredientes	UM	CZ	EE	PB	FB
F. Peixe	12,4	15	9,8	62,8	0
F. de Soja	10,2	6,5	2,5	49,9	5,1
F. de milho	10,5	0,6	4,1	9,1	1,8
F. de trigo	12	0,4	1,2	11,7	1,3
Maracujá	12,9	3,4	9	29,0	37,5
Suplemento. vitamínico/mineral*	0	100	0	0,0	0
Glúten de milho	8,8	2,2	0,5	69,0	5
Óleo de soja	0	0	100	0,0	0

* Composição/Kg: fósforo 0,5%; cobre 2,66 mg; ferro 16,66 mg; iodo 0,25 mg; manganês 25 mg; zinco 16,6 mg; vit. A 3,33 UI; vit E2 UI; vit C 1 ppm; vit D3 800 UI; vit B 10,46 mg; vit B12 3,33 mg; vit B2 1,66 mg; vit K 0,52 mg.

Foram formuladas quatro dietas isocalóricas (365,1 ± 1,3 Kcal de EB/100g) e isoproteicas (29,5% PB), cujos níveis de inclusão da torta de semente de maracujá (TSM) variaram em 0, 10, 20 e 30%, considerando a manutenção da relação Energia (E) : Proteína (P) próxima a 12:1 (Tabela 9).

Tabela 9 - Composição percentual das dietas experimentais.

Ingredientes	Dieta experimental			
	Controle	TSM 10%	TSM 20%	TSM 30%
F. de peixe	17	14	14	13,5
F. de Soja	24	22	19	15
F. de milho	17	7,5	9	1,5
F. de trigo	32	34	25	25
TSM*	0	10	20	30
Suplemento vitamínico/mineral	1	1	1	1
Glúten de milho	7	8	7,5	8
Óleo de soja	2	3,5	4,5	6
Total	100	100	100	100
PB ração	29,2	29,2	29,3	29,5
EB ração	369,6	369,7	369,1	370,0
EB:PB	12,7	12,6	12,6	12,6

* TSM: torta de semente de maracujá; PB: proteína bruta; EB: energia bruta.

Todos os ingredientes, com exceção do óleo de soja, foram pesados individualmente em balança digital (KRATOS, Modelo KBS30K ± 5g), conforme a quantidade necessária por tratamento. Em seguida, os ingredientes de cada ração experimental foram triturados, suplementados com óxido de cromio III a 0,5%, e homogeneizados em betoneira pelo tempo de 10 minutos. A mistura foi adicionada em máquina extrusora monorosca, com condicionador duplo e injeção d'água (INBRAMAQ, Modelo MX80), com velocidade de rosca constante e com matriz de 5 mm.

As rações extrusadas foram distribuídas em bandejas e secas em estufa com recirculação de ar forçada durante 24 horas a 30°C. As quantidades de óleo de soja referentes a cada tratamento foram adicionadas por aspersão. As rações retornaram à estufa para secagem, pelo mesmo período e temperatura supracitados. Todas as rações experimentais foram armazenadas em sacos de ráfia, identificados e estocados em sala climatizada, a uma temperatura de 22°C.

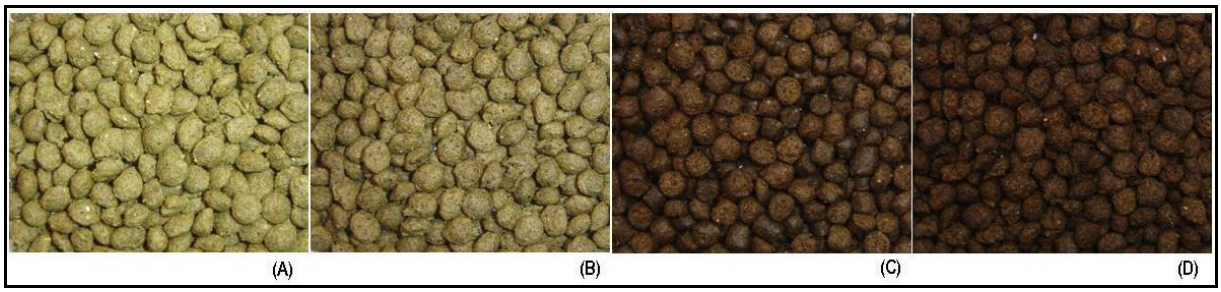

Figura 1 - Rações experimentais com níveis crescentes de TSM: (A) 0%, (B) 10%, (C) 20% e (D) 30%.

Diariamente, foram monitoradas as concentrações de oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T) e condutividade elétrica, por meio de aparelho digital YSI modelo 85. O pH foi mensurado com aparelho digital YSI modelo 60. Os níveis de amônia foram determinados pelo método do endofenol, e os de nitrito foram analisados por meio de kits colorimétricos, ambos semanalmente.

Foram utilizados 12 tanques de fibra de vidro, com formato cilíndrico-cônico e volume útil de 80 litros. Na porção inferior de cada cone, foi adaptado um terminal coletor de fezes rosqueável, ligado a um registro hidráulico (Figura 2). A água, procedente de poço artesiano, foi fornecida pela porção superior dos cones, por torneiras reguladas para taxa de renovação de aproximadamente 5% do volume total/cone/ hora.

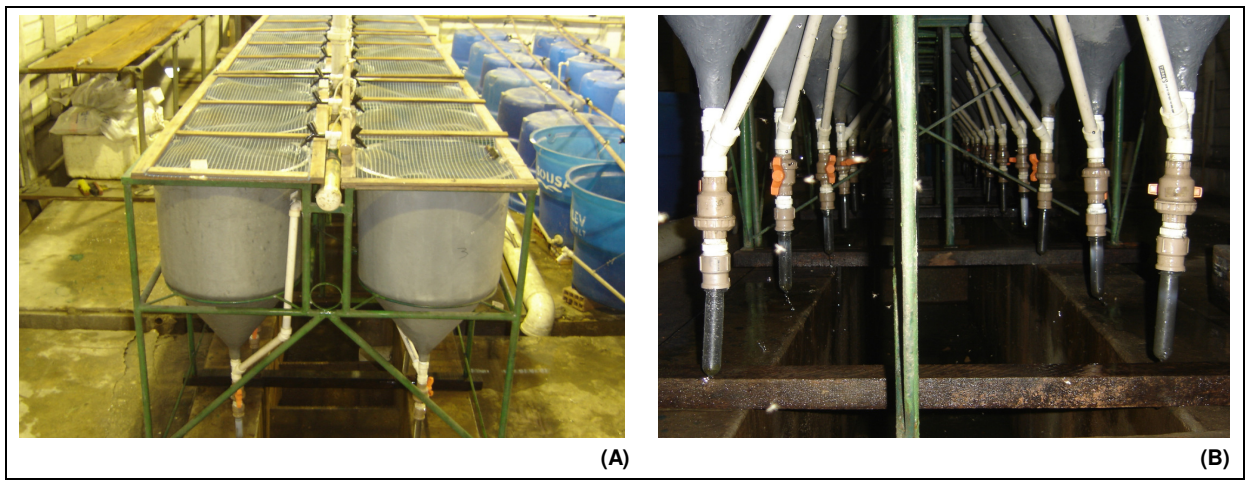

Figura 2 - Unidades experimentais utilizadas para o acondicionamento dos juvenis de tambaqui (A); Detalhe dos Coletores de fezes (B)

Após uma semana de aclimatação, os tambaquis foram anestesiados com benzocaína, na concentração de 100 mg/l, pesados em balança digital (FILIZOLA, MF-3) com 0,5g de precisão e distribuídos nos cones por meio de baldes. No início

do experimento, 30 peixes foram anestesiados e pesados individualmente, sendo a média e o desvio padrão atribuídos para todos os tratamentos. Cada cone recebeu 17 peixes com peso médio de 14,03 ± 0,19 g cada, resultando em densidade de estocagem de 4,7 animais/litro.

Os tambaquis foram mantidos em jejum no primeiro dia de experimento. A partir do segundo dia, foram alimentados com rações experimentais, contendo óxido de cromio (Cr2O3) 0,5%.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 horas). Após 30 minutos do fornecimento das rações, os peletes não ingeridos e as fezes decantadas pelo registro hidráulico foram retirados. Somente então, foram colocados os terminais para a coleta de fezes.

Após a primeira semana de experimento, foi iniciada a coleta das fezes pelo método de decantação em coluna d'água, seguindo a metodologia de Cho *et al.* (1985). As fezes coletadas foram homogeneizadas e congeladas em placas de Petri, onde foram liofilizadas e analisadas bromatologicamente.

A determinação do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca e proteína bruta dos ingredientes das rações seguiu a metodologia de Cho *et al.*, (1985) e Cho *et al.* (1987). A análise da determinação da concentração de óxido cromio III nas amostras de rações e fezes foi efetuada por método colorimétrico, conforme metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966).

3.1 Digestibilidade aparente de nutrientes (CDAn) e energia (CDAeb)

$$CDA_{n/eb} = 100 \times 1 - \left[\frac{(Cr_2O_3 \text{ dieta}) \times \%\, f_{n/e}}{(Cr_2O_3 \text{ fezes}) \times \%\, r_{n/e}} \right]$$

Sendo:

$CDA_{n/eb}$ = Coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes e energia;

Cr_2O_3 dieta = % de óxido de cromio III na ração;

Cr_2O_3 fezes = % de óxido de cromio III nas fezes;

% $f_{n/e}$ = % de nutriente ou energia nas fezes;

% $r_{n/e}$ = % de nutriente ou energia na ração.

3.2 Digestibilidade total (DT)

$$DT = 100 - 100 \times \left[\frac{\% \, Cr_2O_3 \text{ na ração}}{\% \, Cr_2O_3 \text{ fezes}} \right]$$

3.3 Energia digestível (ED)

ED = Ed - [(Ef x Id)If]

Sendo:

Ed = energia na dieta;

Ef = energia nas fezes;

Id = indicador na dieta;

If = indicador nas fezes.

3.4 Digestibilidade do ingrediente

$CDA_{ingr} = CDA_{teste} + ((1-s)Dr/sDi)\ (CDA_{teste} - CDA_{controle})$

Sendo:

CDA_{ingr} = CDA do ingrediente testado

1-s = % da ração controle na ração teste

Dr = % do nutriente da ração teste

S = % do ingrediente teste na ração

Di = % do nutriente do ingrediente teste

CDA_{teste} = CDA da ração teste

$CDA_{controle}$ = CDA da dieta controle

O experimento foi configurado por quatro tratamentos, cada qual com três repetições, levando em consideração os níveis de inclusão dos resíduos do ingrediente alternativo. O experimento teve a duração de 21 dias, sendo as coletas de fezes efetuadas em intervalos de 4 horas. Os valores das repetições dos CDAs das diferentes dietas experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) one way, com nível de significância de 5%, pelo software STATISTICA® (Statisoft, 1995). Foi aplicado o teste de Tukey ($p<0,05$) para a discriminação das médias onde a ANOVA apontou diferença significativa entre os tratamentos.

3. Resultados

Os valores percentuais dos ingredientes das rações contendo níveis crescentes de inclusão de torta de semente de maracujá (TSM) resultantes de análise químico-bromatológica estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 - Análise químico-bromatológica das rações experimentais

Nutrientes	Rações			
	Controle	TSM 10%	TSM 20%	TSM 30%
MS	92,1±0,0[a]	93,5±0,7[b]	94,0±0,0[b]	93,4±0,0[b]
UM	7,9±0,0[a]	6,5±0,7[b]	6,0±0,0[b]	6,6±0,0[b]
CZ	5,5±0,2[a]	5,3±0,4[a]	5,4±0,2[a]	5,2±0,2[a]
EE	3,0±0,2[a]	4,4±0,0[b]	6,3±0,1[c]	8,0±0,0[d]
CNE	21,0±0,5[a]	20,0±1,5[a]	14,9±0,6[b]	9,4±0,9[c]
FDN	25,0±0,5[a]	29,1±0,6[b]	32,4±0,2[c]	35,1±0,9[d]
PB	37,6±0,0[a]	34,7±0,0[b]	35,0±0,6[b]	35,7±0,7[b]
EB	430,1±2,6[a]	439,2±1,7[b]	451,2±0,3[c]	459,9±0,3[d]
EB:PB	11,4±0,0[a]	12,9±0,2[b]	12,9±0,1[b]	12,9±0,2[b]

MS: matéria seca; UM: umidade; CZ: cinza; EE: extrato etéreo; CNE:carboidrato não estrutural; FDN: fibra em detergente neutro; PB: proteína bruta; EB: energia bruta.
Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Dentre os valores obtidos, obeservou-se que os percentuais de MS, UM e PB, diferiram significativamente entre a ração controle e as rações dos tratamentos TSM 10, 20 e 30%. Estes, não diferiram significativamente entre si, sendo que todos os tratamentos apresentaram valores de PB acima do esperado. Os percentuais de EE e FDN diferiram significativamente entre todos os tratamentos e apresentaram valores crescentes conforme o nível de inclusão de TSM nas rações. Os valores de EB foram significativamente diferentes entre os tratamentos. A relação EB:PB do tratamento controle foi significativamente mais baixa que a dos demais tratamentos. Os teores de lignina, celulose e hemicelulose estimados estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Médias, regressão e coeficientes de determinação (r2) dos valores da Lignina, Celulose e Hemicelulose em função dos níveis de inclusão de TSM.

Constituintes fibrosos	Rações				Regressão	r^2
	Controle	TSM 10%	TSM 20%	TSM 30%		
Lignina	0,8±0,8	4,9±0,8	5,9±0,0	8,5±0,4	y = 0,241x + 1,41	0,9457
Celulose	4,7±0,1	6,3±1,8	12,5±4,0	16,5±2,5	y = 0,416x + 3,76	0,9584
Hemicelulose	19,9±0,4	17,9±0,9	16,8±1,7	10,0±1,7	y = -0,306x + 20,79	0,8411

TSM: torta de semente de maracujá.

Os teores de lignina e celulose variaram de 0,8 a 8,5, e de 4,7 a 16,5% respectivamente, e aumentaram linearmente com o incremento de TSM nas rações. O oposto foi verificado para os teores de hemicelulose, que decresceram linearmente de 19,9 a 10%, conforme o incremento de TSM.

Os valores médios dos parâmetros de qualidade da água monitorados durante o experimento não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros monitorados de qualidade da água.

Parâmetro	Unidade de medida	Tratamentos			
		Controle	TM 10%	TM 20%	TM 30%
OD	mg/l	4,9± 0,1	4,9± 0,0	4,9± 0,0	5,0± 0,2
Temperatura	°C	27,0± 0,0	27,1± 0,2	27,4± 0,3	2,07± 0,2
pH		5,7± 0,2	5,6± 0,4	5,9± 0,6	5,7± 0,4
Condutividade	$\mu S.cm^2$	20,0± 0,8	19,0± 0,8	22,0± 0,8	20,0± 0,4
Amônia total	mg/l	0,4± 0,2	0,5± 0,1	0,4± 0,2	0,4± 0,2
Nitrito	mg/l	0,01± 0,2	0,01± 0,0	0,01± 0,0	0,01± 0,0
CO_2	mg/l	0,6± 0,2	0,5± 0,1	0,5± 0,2	0,5± 0,1

TSM: torta de semente de maracujá

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) da matéria seca e dos nutrientes das rações com níveis crescentes de inclusão de torta de maracujá estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Coeficiente de digestibilidade aparente das rações contendo níveis crescentes de inclusão de torta de semente de maracujá para juvenis de tambaqui.

Tratamento	CDA (%) dos nutrientes das Rações			
	Controle	TSM 10%	TSM 20%	TSM 30%
MS	87±0,7[a]	85±1,4 [a]	77±1,2[b]	77±2,7 [b]
EE	96±0,5[ab]	95±1,3 [a]	96±1,0 [ab]	98±0,8 [b]
PB	94±0,2 [a]	94±0,7 [a]	91±0,8 [b]	91±0,0 [b]
CNE	85±4,3 [a]	95±3,0 [b]	96±2,3 [b]	87±1,7 [a]
FDN	49±3,7 [a]	53±3,0 [ab]	57±1,2 [bc]	59±0,9 [c]

CDA: coeficiente de digestibilidade aparente; MS: matéria seca; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; CNE:carboidrato não estrutural; FDN: fibra em detergente neutro;
Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Os CDAs da MS e PB da ração controle ou da ração com 10% de nível de inclusão de TSM foram significativamente iguais entre si, porém superiores aos CDAs das rações com 20 e 30% de nível de inclusão de TSM.

Os CDAs dos CNEs das rações referentes aos tratamentos com 20 ou com 30% de inclusão de TSM foram significativamente iguais entre si, porém superiores aos CDAs das rações controle e 30% de nível de inclusão de TSM.

Os CDAs das FDNs referentes aos tratamentos com 20 e 30% de inclusão de TSM não foram significativamente diferentes entre si, porém foram superiores ao CDA da ração controle.

Os CDAs dos teores de Celulose e Hemicelulose estimados e seus respectivos coeficientes de determinação em função dos resíduos de lignina das fezes de tambaqui estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Médias, regressão e coeficientes de determinação (r^2) dos valores de CDA da Celulose e Hemicelulose em função dos teores de lignina obtidos das fezes.

Lignina	Controle %	TSM 10%	TSM 20%	TSM 30%	Regressão	r^2
	1,0±1,1	15,5±4,7	12,0±0,7	25,8±5,5		
Celulose	25,5±0,8	25,0±3,9	30,0±4,8	27,3±5,9	y = 0,2042x + 25,297	0,3428
Hemicelulose	22,0±0,5	12,5±0,5	15,0±5,8	6,5±0,5	y = -0,7262x + 23,168	0,9893

O CDA de celulose apresentou valor médio mínimo de 25,5% para a ração controle, e valor médio máximo de 30% para a ração contendo 20% de TSM. O coeficiente de determinação foi igual a 0,34, e os valores médios dos CDAs de hemicelulose mantiveram-se constantes conforme o incremento de resíduo de lignina das fezes.

O CDA de hemicelulose apresentou valor médio mínimo de 6,5 para a ração contendo 30% de TSM, e valor médio máximo de 22% para a ração controle. O coeficiente de determinação foi igual a 0,98, e os valores médios dos CDAs de hemicelulose decresceram linearmente conforme o incremento de resíduo de lignina das fezes.

4. Discussão

Os parâmetros monitorados de qualidade da água apresentaram valores médios considerados adequados para o cultivo de peixes (Boyd, 1982), e estiveram dentro da faixa de conforto para tambaquis (Ismiño-Orbe, 1997; Aride,1998; Araújo-Lima & Goulding, 1997).

O intervalo de tempo de quatro horas ininterruptas para a coleta de fezes foi estabelecido com a finalidade de padronizar o erro de superestimar os valores dos CDAs, devido a lixiviação dos nutrientes das fezes para a coluna de água (Furuya *et al.*,2001), bem como o de subestimar os CDAs por conseqüência da proliferação bacteriana nas fezes decantadas.

Foram testadas várias metodologias para coleta de fezes em peixes (dissecação intestinal, extrusão manual, sucção anal, pipetagem imediata na água, filtração contínua de água e decantação das fezes) com o intuito de averiguar as mais adequadas para a padronização, por Abimorad e Carneiro (2004).

O sistema Guelf, que é utilizado com frequência, foi comparado ao sistema de dissecação por Hajen *et al*,(1993), que concluiu não haver diferença nos valores de seus CDAs para Onchorhynchus tshawytscha .

A interpretação das análises para determinação da digestibilidade demonstra que o nível de inclusão de 10% foi o mais apropriado, por ter gerado melhores CDAs dos nutrientes, embora a ração controle apresente maior conteúdo de energia bruta disponível, quando comparada com os conteúdos energéticos das demais rações do experimento, o que causou desbalanceamento na relação EB:PB, fato que pode mascarar a análise comparativa entre os CDAs dos tratamentos.

Entretanto, os valores de CDAs dos nutrientes e da matéria seca entre os tratamentos não foram tão discrepantes a ponto de se considerar que os níveis de inclusão da TSM utilizados a 20 e 30% tenham inviabilizado as rações quanto à digestibilidade aparente dos ingredientes.

Para juvenis de tambaquis, os valores médios, mínimos e máximos de CDAs da proteína, do extrato etéreo e da matéria seca obtidos (Proteína, 91 a 94%; MS, 77 a 87%; EE, 95 a 98%), assemelharam-se aos CDAs obtidos por Oishi (2007), que testou a inclusão da farinha de resíduo da castanha da Amazônia em níveis de 0,

10, 20 e 30%, e obteve valores de CDAs da proteína entre 89 e 93%, da MS entre 77 e 86% e do EE entre 93 e 95%.

Os valores de CDAs da FDN e CNE das rações contendo TSM demonstraram que tal resíduo pode ser substituto, por exemplo, do farelo de soja, sobretudo no nível de 10%. Porém, a observação de valores crescentes dos teores de FDN e decrescentes dos teores de CNE em relação ao aumento da inclusão de TSM nas rações experimentais sugerem que quanto maior for o valor obtido da relação FDN/CNE, menor será a digestibilidade da PB e da MS.

A digestibilidade da MS decresceu conforme o aumento do nível de inclusão de TSM. Segundo Mertens (1992) o consumo de MS pode ter relação inversa ao teor de FDN contido na dieta, visto que constituintes da parede celular mostraram-se negativamente correlacionados com a degradação da MS da fração volumosa (Silva *et al*., 2000). Corroborando o resultado supracitado em trabalhos com tilápia, Shiau *et al*. (1988) e Lanna *et al*. (2004) observaram que o incremento da fibra bruta resultou em efeito decrescente de digestibilidade da MS.

Na nutrição de ruminantes, a identificação do grau de lignificação da celulose ocorre pela estimativa da digestão ruminal em diversos tempos de incubação, até atingir o grau de FDN indigerível (Berchielli *et al*., 2000). No estudo de nutrição de peixes, tal determinação poderá ser adaptada para uma metodologia de digestão *in vitro*. Deste modo, qualquer diferença de digestão pode ser devidamente explicada pelos dados aqui apresentados.

Comparativamente aos teores de FDN das rações aqui testadas, valores elevados de fibra bruta em rações para peixes constituem barreira para a digestibilidade de nutrientes (Dioundick e Stom 1990; Pereira-Filho, 1989), e podem comprometer a digestibilidade aparente de todos os nutrientes (Hilton *et al*., 1983) ou parte deles. Lanna *et al*., (2004), verificaram que níveis crescentes de fibra bruta em dietas purificadas para tilápia (*Oreochromis niloticus*) interferiram significativamente na digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e do extrato etéreo.

Essas situações limitam o uso de ingredientes de origem vegetal com elevada concentração de fibra bruta em dietas para peixes, tais como o farelo de algodão, e o dendê, entre outros, especialmente nos animais jovens. Entretanto, há a

comprovação de que a degradação das paredes celulares dos ingredientes de origem vegetal permite a maximização da ação enzimática endógena do animal sobre a degradação do amido, da gordura e da proteína, aumentando sua digestibilidade (Oliveira *et al.*, 2006).

A utilização da metodologia de FDA está desprovida de base teórica consistente para ser utilizada na determinação da digestibilidade de nutrientes (Van Soest, 1994). Portanto, adequou-se aqui como base para os cálculos da lignina.

A lignina provê informação relacionada à fração não digerível das rações testadas, e foi aqui referendada como marcador, como utilizado em ruminantes (Church, 1998). A redução gradual dos CDAs da hemicelulose em função do aumento dos níveis de TSM nas rações pode ocorrer pelo incremento proporcional dos teores de lignina das rações, mais do que pela própria diminuição dos CDAs da hemicelulose, visto que a digestibilidade de um substrato pelos seus organismos decompositores pode ser avaliada por essa razão (Souza-Souto *et al.*, 2007).

O grau de polimerização da celulose varia, dentre outros fatores, de acordo com a fonte e o grau de maturação da parede celular (Timar-Balazsy e Eastop 1998). Em sementes, a lignificação do tegumento é uma característica relevante na proteção da parede celulósica ao ataque de microorganismos (Kannenberg e Allard 1964, Santos *et al.*, 2007). Mesmo com essa prerrogativa, que pode dificultar ainda mais a ação digestiva (Souza-Souto *et al.*, 2007), verificou-se comportamento oposto ao da relação lignina-hemicelulose. No caso do CDA da celulose, o coeficiente de determinação de 0,34 traduziu que 66% dos valores de seu CDA não dependeram dos valores residuais da lignina, sugerindo que a celulose possa ter sido digerida, provavelmente por bactérias presentes em seus intestinos.

5. Conclusão

A torta de semente de maracujá apresenta potencial para ser utilizada como substituta de subprodutos agroindustriais, e é tecnicamente viável incluí-la no nível de 10% em rações extrusadas, sem que haja decréscimo significativo de digestibilidade aparente em juvenis de tambaqui.

6. Referências Bibliográficas

Araujo-Lima, C.R.M.; Goulding, M. 1997. So fruitful fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui. New York: Columbia University Press,. 157p.

Aride, P.H.R. 1998. Efeito do pH nos parâmetros hematológicos e no ganho de peso de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 52pp.

Berchielli, T. T.; Andrade, P.; Furlan, C. L. 2000. Avaliação de Indicadores Internos em Ensaios de Digestibilidade Revista Brasileira de Zootecnia, 29(3):830-833,

Berchielli, T.T.; Pires, A.V.; Oliveira, S.G. 2006. Nutrição de Ruminantes, Jaboticabal, FUNEP, 583p.

Boyd, C.E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Amsterdam: Elsevier Science, 317p.

Chau C.F., Huang Y.L 2004.. Characterization of passion fruit seed fibres—a potential fibre source. Food Chemistry ,85,189–194

Cho, C. Y. 1987. La energía en la nutrición de los peces. In: Espinosa de los Monteros, J.; Labarta, U. (Ed.) Nutrición en Acuicultura II. Madrid.

Cho, C. Y; Cowey, C.B.; Watanabe, T. 1985. Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development. Otawa, IDRC. 154p..

Church, D.C. 1998. The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. New Jersey: Prentice Hall. 564p

Dioundick, O.B.; Stom, D. 1990. Effects of dietary á-cellulose on the juvenile tilapia, Oreochromis mossambicus (Peters). Aquaculture, v.91, n.3/4, p.311-315.

Ferrari, R.A.;Colussi, F.; Ayub, R.A. 2004. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, SP, v. 26, n. 1, p. 101-102.

Freeman, Z. J. 1995. Amazonian aquatic resources, fishery management and aquaculture development. Senior thesis, Woodrow Wilson School. 123p.

Furukawa, A.; Tsukawara, H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as na index in the study of digestibility of fish feed. Bulletin Of the Japanese. Society. Science Fisheries, 32: 502-506.

Furuya, W.M.; Pezzato, L. E.; Miranda, E. C.; Furuya, V. R. B.; Barros, M. M. 2001. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para Tilápia (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia, 30, 1143-1149,.

Goulding, M. 1980. The fish and the forest. Explorations in Amazonian Natural History. University of California Press, Los Angeles, 280p.

Graef, E.W. 1995. As espécies de peixes com potencial para criação no Amazonas. In: Val. A.L.; Honczaryc, A. Criando peixe na Amazônia. 19. ed. Manaus: INPA, p.29-43.

Hajen, W .E.; Beames, R. M.;Higgs, D. A.; Dosanjh, B.S. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) in sea water. 1. Validation of technique. Aquaculture, Amterdam, 112: 321-332.

Hayashi, c.; Meurer, f.; Boscolo, w.r.; Soares, C.M. 2000. Fontes de fibra bruta em dietas de alevinos de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus). Acta Scientiarum, 22, 689-694.

Hilton, J.W.; Atkinson, J.L.; Slinger, S.J. 1983. Effect of increased dietary fiber on the growth of raimbow trout (Salmo gairdinerri). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 40, 81-85.

Ismiño-Orbe, R.A. 1997. Excreção e efeito da amônia sobre o crescimento do tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1818). 29p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

Júnior, J. E. L; Costa, J. M. C.; Neiva, J. N. M.; Rodriguez, N. M. 2006. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal Revista Ciência Agronômica, 37, (1), 70-76.

Kannenberg, J. W.; Allard, R.W. 1964. An association between pigment and lignin formation in the seed coat of the Lima bean. Crop Science, Madison, n.4, p.621-622.

Lagler, K. F.; Bardach, J. E.; Miller, R. R. 1962. Ichthyology. The study of fishes. New York, 243p.

Lanna, E. A. T.; Pezzato, E. L.; Cecon, P. R.; Furuya, W. M., Bomfim, M.A.D. 2004. Digestibilidade Aparente e Trânsito Gastrintestinal em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em Função da Fibra Bruta da Dieta. Revista Brasileira de Zootecnia, v.33, n.6, p. 2186-2192

Lassiter, J.M.; Eduards Jr, H.M. Animal nutrition. Reston Publishing Company. 1982.

Lee, K. E.; Wood, T. G. 1971. Termites and soils. London: Academic Press, 251p

Lehninger, A.L. 1991. 725p Princípios de bioquímica. 7.ed. São Paulo: Sarvier..

Mertens, D.R. 1992. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: Simpósio Internacional de Ruminantes. Anais... Lavras: SBZ-ESAL, 188p.

Nacional Research Council – NRC. 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy of Science of Washington, Washigton, USA.

Oishi, C. 2007. Uso de resíduo da castanha da amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente alternativo em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Dissertação de mestrado: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 63pp.

Oliveira, G. R. 2006. Digestibilidade *de nutrientes em ração com* complexo enzimático para *tilápia-do-Nilo* (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 102pp.

Oliveira, L. F., Nascimento, M. R. F., Borges, S. V. 2002. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg.*) para produção de doce em calda. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 22, (3), 259-262.

Penz JR., A.M.1996. Enzimas y preservadores em dietas de aves y cerdos. Alim. Balan. para Anim., 3(6):16-24.

Pereira-Filho, M. 1989. Efeito de diferentes níveis de proteína e de fibra no desempenho, digestibilidade da fração protéica e características da carcaça de carpa *(Cyprinus carpio L. 1758).* Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Universidade Estadual de São Paulo, 96pp.

Pereira-Filho, M. 1992. Importância da fibra na nutrição dos peixes. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 7. Peruíbe. Anais... Peruíbe: ABRAq,. p.1-10.

Pereira-Filho, M. 1995. Alternativas para a alimentação de peixes em cativeiro. In: Val, A.L.; Honczaryk, A. (Eds.) Criando peixes na Amazônia. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. p.75-82.

Pezzato, L. E.; Miranda, E. C.; Barros, M. M.; Pinto, L.G.Q.; Furuya, W. M.; Pezzato, A.C. 2002. Digestibilidade Aparente de Ingredientes pela Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus). Revista Brasileira de Zootecnia, 31(4):1595-1604.

Pezzato, L.E. 1995. Alimentos convencionais e não-convencionais disponíveis para indústria da nutrição de peixes no Brasil. In: Simpósio Internacional Sobre Nutrição e Crustáceos, 1. *Anais...*Campos do Jordão, p.34-52.

Prada e Silva, L. F.; Machado, P. F., Junior, J. C. F.; Donizetti, M.; Pereira A. R.; 2000Relação entre a Composição Química e a Degradabilidade *In situ* da Matéria Seca e da Fibra em Detergente Neutro da Fração Volumosa de Híbridos de Milho1 Revista brasileira de zootecnia, 29(1):288-294.

Ray, A.K.; Bairagi, A.; Ghosh, K. S.; 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by B*acillus subtilis* cy5 and *Bacillus circulans* tp3 isolated from fish gut. Acta Ichthyologica et Piscatoria 37 (1): 47–53

Reis, R.A.; Rodrigues, L. R. A. 1993. Valor nutritivo de plantas forrageiras. Jaboticabal, 26p.

Reis, S.T. 2000. Valor nutricional de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte. Lavras: UFLA. 99p.

Rolim, P.R. 1995. A infra - estrutura básica para criação de peixes no Amazonas. *In*: Val, A. L.; Honczaryk, A. Criando peixe na Amazônia. 19. ed. Manaus: INPA, p. 7-16.

Roubach, R. 1991. Uso de frutos e sementes de florestas inundadas na alimentação o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 79pp.

Santos, E. L.; POLA, J. N.; Barros, A. S. R.; Prete, Cavenaghi, C. E. 2007. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com

variação na cor do tegumento. Revista brasileira de sementes. 29, 1, pp. 20-26.

Shiau, S. Y.; YU, H. L.; H. W. A, S. 1988.The influence of carboxymethycellulose on growth, digestion, gastric emptying time and body composition of tilapia. Aquaculture, 70, p. 345-354.

Silva, J. A. M. 1997. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*Colossoma macropomum,* Cuvier,1818) nas florestas inundáveis da Amazônia Central. Manaus: Tese. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas. 142p.

Silva, J. A. M.; Filho. M. P., Oliveira-Pereira, M. I. 2003. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macrompum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal, Revista Brasileira de Zootecnia., 32, (6): 1815-1824.

Silva, J. A. M.; Pereira-Filho, M.; Cavero, B. A. S.; Oliveira-Pereira, M. I. 2007. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colosssoma macropomum* CUVIER, 1818). Acta Amazônica, 37(1): 157 – 164.

Sniffen, C. J., O' Connor, J. D. Van Soest, P. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, 70: 3562-3577.

Sousa-Souto, L.; Guerra, M. B. B. ; Schoereder, J. H.; Schaefer, C. G. E. R. ; Silva, W. L. 2007. Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado. Revista Árvore, Viçosa, 1, 31.

Storebakken, T.; Kvien, I.S.; Shearer, K.D.; Grisdale-Helland, B.; Helland, S.J. 1999. Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. Aquaculture, 172: 291-299.

Timar-Balazsy, A.; Eastop, D. 1998. Chemical principles of textile conservation. London: Butterworths 8, 329-334.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2ªed. Cornell: Cornell University Press. 476p.

Van Soest, P.J.; Wine, R.H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant-cell constituents. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v.50, p.50-55,.

Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. 3ªed. Prentice-Hall, Englewood Clifes, NJ. 662p.

CAPÍTULO III - DIGESTIBILIDADE APARENTE, DESEMPENHO PRODUTIVO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO EXTRUSADA CONTENDO BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE E XILANASE

RESUMO

Ração contendo 30% de TSM foi usada como substrato para a inoculação de concentrações crescentes de linhagem bacteriana, chamada TR9, isolada do intestino de tambaqui coletado em ambiente selvagem. A linhagem mencionada, que produz celuloses e xilanase, foi fornecida para juvenis de tambaqui em níveis de concentrações de 0, 10^3, 10^5 and 10^7 UFC. O Coeficiente de Digestibilidade Aparente, as Variáveis de Desempenho Produtivo e a Composição Corporal foram usadas como parâmetros de avaliação. Os resultados demonstraram que a linhagem bacteriana TR9 não influenciou nos parâmetros de avaliação para os juvenis de tambaqui submetidos ao experimento.

ABSTRACT

Feed containing 30% PFSM was used as substract for the inoculation of growing concentrations of a bacteria strain, called TR9, deriving from the intestines of tambaqui collected from a wild environment. The aforementioned strain, which produces cellulose and xylanase, was provided to juvenile tambaqui at concentration levels of 0, 10^3, 10^5 and 10^7 UFC. The Apparent Digestibility Coefficient, Productive Performance Variables and Body Composition were used as evaluation parameters. The results showed that the TR9 did not influence the above parameters regarding the juvenile tambaqui submitted to the experiment.

1. Introdução

Ingredientes de origem vegetal são empregados na nutrição animal pelo fornecimento de proteína e energia. Estes são ricos principalmente em carboidratos (Van Soest, 1994) que, em muitos casos, não atendem às necessidades nutricionais dos animais de cultivo, já que parte dos carboidratos é constituída por elementos não digeríveis, como polissacarídeos não amiláceos (PNAs), que também são fatores antinutricionais (FAN) (Francis *et al.*, 2001).

Os PNAs componentes das paredes celulares presentes em alimentos de origem vegetal comumente encontrados em rações para peixes (Meurer *et al.*, 2003) apresentam como constituintes principais a celulose, hemicelulose, pectina e lignina (Bijlani, 1985; Van Soest, 1994; Silva, 1990; Larbier e Leclercq, 1992). Dentre estes constituintes, as pectinas são consideradas de fácil digestão, e são mais comumente encontradas em polpas de frutas cítricas, tubérculos e raízes (Hall, 2001).

O revés da pectina é observado na lignina, composto não carboidrato de elevado peso molecular associado à celulose e hemicelulose. Forma-se durante o desenvolvimento da parede celular e altera significativamente a digestibilidade dos vegetais (Norton, 1982), atuando como barreira mecânica à ação de enzimas digestivas (Carré *et al.*,1990).

A celulose é o principal componente estrutural de vegetais superiores e está fortemente associada à lignina e hemicelulose (Ramos, 2003). Representa aproximadamente 40% da biomassa de resíduos agrícolas (Klyosov, 1995), e a sua degradação, assim como da hemicelulose, assume papel importante, pois são utilizadas por outros organismos como fonte de energia, na forma de sacarídeos simples (Béguin e Aubert, 1994).

As celulases atuam com maior eficiência por meio do sinergismo de suas enzimas, o que resulta no aumento da velocidade de degradação do substrato (Klyosov, 1995). Enzimas como a celulase, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, por tanto, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para o desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann *et al.*, 1980).

A hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo, ligado covalentemente à lignina, que, por sua vez, não está ligado covalentemente à celulose (Jung, 1989). É abundante nas paredes celulares das plantas (Wilkie e Woo, 1977) e apresenta-se na forma de xilano em cereais e madeiras duras (Timell, 1967). O componente das hemiceluloses das plantas presente em maior quantidade é o xilano, que, depois da celulose, constitui o polissacarídeo renovável mais abundante na natureza (Biely, 1985). Os xilanos encontrados principalmente na parede celular secundária formam interfaces entre a lignina e o conjunto de fibras de celulose, e, devido a suas características de adesão, auxiliam na manutenção da integridade da parede celular (Prade, 1995).

O hábito alimentar do tambaqui de quebra de sementes e frutos (Honda, 1974) expõe nutrientes encontrados nas camadas mais interiorizadas. É fator importante porque a quantidade total de proteína na parede celular de ingredientes de origem vegetal pode somar de 10% a 30% do total da fibra (Carré *et al.*,1990).

Não obstante a própria evolução adaptativa do tambaqui, os processos de fabricação de rações minimizam esse problema pela desobstrução mecânica via trituração de itens alimentares. Os melhores resultados de conversão alimentar e desempenho produtivo têm sido proporcionados por rações extrusadas (Pezzato *et al.*, 2002), haja vista que, dentre outros fatores, a redução do tamanho da fibra facilita a sua digestibilidade (Jerger *et al.*,1982).

As celulases e hemicelulases têm grande potencial de aplicação na indústria de ração e suplementos para animais (Bhat, 2000). Entretanto, devido ao elevado custo das enzimas na alimentação animal, microrganismos específicos que produzem estas enzimas são considerados alternativa para a degradação de componentes fibrosos (Belal, 2008).

Bairagi *et al*, (2004) demonstraram ser possível incorporar 40% de folhas de Leucaena em dietas para carpas quando inoculadas com bactérias produtoras de enzimas. Silva *et al.* (2003) verificaram que o tambaqui possui habilidade de digerir fibra bruta de determinados frutos e sementes, atribuindo esta capacidade a provável produção de celulase pela flora gastrointestinal, campo para futuras investigações.

Neste sentido, faz-se necessário que sejam realizados estudos sobre alternativas para a melhoria de aproveitamentos de rações pelo tambaqui, sejam elas com novos ingredientes regionais com potencial para utilização em rações comerciais, seja com o uso de produtos da biotecnologia disponível no mercado que possam maximizar sua produção em cultivos a baixo custo no Brasil.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inclusão crescente de linhagem bacteriana produtora de celulases e xilanase em ração extrusada contendo 30% de TSM na digestibilidade aparente, nas variáveis de desempenho produtivo e na composição corporal de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

2.2 Objetivos Específicos

Determinar os CDAs de rações extrusadas contendo níveis crescentes de linhagem bacteriana produtora de celulases e xilanase.

Avaliar as variáveis de desempenho produtivo de juvenis de tambaqui alimentados com rações extrusadas contendo níveis crescentes de linhagem bacteriana produtora de celulases e xilanase.

Determinar a composição corporal de juvenis de tambaqui alimentados com rações extrusadas contendo níveis crescentes de linhagem bacteriana produtora de celulases e xilanase.

3. Material e Métodos

O experimento foi realizado nos estabelecimentos da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPAQ-INPA).

Quinhentos tambaquis com peso médio de 0,5 g, procedentes da fazenda comercial Santo Antônio, Manaus, AM, foram estocados em viveiro escavado de 24m^3. Os alevinos foram alimentados com ração comercial 40% PB, três vezes ao dia, com taxa de 5% da biomassa total. Diariamente, efetuou-se a troca de 5% do volume total de água dos viveiros.

Após o período de crescimento, os peixes foram realocados para um sistema de aclimatação, localizado no galpão de experimentos. O transporte, a liberação e o manejo dos peixes seguiram os mesmos procedimentos descritos na metodologia do Capítulo II.

Foi utilizado como ingrediente teste, o resíduo do despolpamento de maracujá (*Passiflora edulis*) procedente do mesmo lote utilizado para a confecção das rações no experimento relatado no Capítulo II. O processamento do ingrediente seguiu a mesma metodologia.

Foram utilizados os dados referentes à análise da composição centesimal do ingrediente alternativo adquirido para o balanceamento da ração do Experimento II.

A composição centesimal da ração experimental e das fezes coletadas de cada tratamento seguiu a metodologia da AOAC (1995), e em triplicata.

A determinação da umidade, da proteína bruta, do extrato etéreo, da cinza, da fibra em detergente neutro, da fibra em detergente ácido, dos carboidratos não estruturais e da energia bruta seguiu as metodologias descritas no Capítulo II.

Foi utilizada a formulação da ração TSM 30% que configurou o Tratamento 3 do experimento referente à metodologia do Capítulo II (Tabela 15).

Tabela 15 - Composição percentual das dietas experimentais.

Ingredientes	Ração TSM 30%
Farinha de peixe	13,5
Farelo de Soja	15
Farinha de milho	1,5
Farinha de trigo	25
Torta de semente de Maracujá	30
Suplemento vitamínico	1
Glúten de milho	8
Óleo de soja	6
Total	100
PB ração	29,5
EB ração	370,0 Kcal/g
EB:PB	12,6

PB: proteína bruta; EB: energia bruta.

Os procedimentos referentes à extrusão foram executados conforme discorre a metodologia no Capítulo II.

A linhagem bacteriana TR9 foi escolhida para ser inoculada na ração. Para tanto, a linhagem foi repicada em placas de petri contendo Ágar Mueller-Hinton e incubada em estufa eletrônica, em temperatura de 30°C, pelo período de 24 horas. Após este período, foi efetuada a separação das colônias bacterianas do ágar por meio de raspagem, com auxílio de lâmina de microscópio. A biomassa bacteriana foi então diluída e homogeneizada em três tubos de ensaio contendo 10 ml de solução salina 0,89%, que foram ajustados respectivamente para as concentrações aproximadas de 10^9, 10^7 e 10^5 células/ml, de acordo com a escala de Mac Farland.

Os tubos contendo as concentrações bacterianas permaneceram inclinados durante uma hora para que houvesse a decantação bacteriana. O sobrenadante foi descartado, e o volume de 5ml contendo a biomassa bacteriana foi padronizado para a homogeneização com os volumes pré-estipulados de óleo de soja, conforme procedimento prévio ao balanceamento da ração. O mesmo procedimento foi realizado para o tratamento controle, contudo, isento da linhagem bacteriana.

Cada solução foi aspergida em 1Kg de ração, material este que foi seco em estufa de recirculação, durante período de 24 horas, a 30°C. As concentrações bacterianas dos tratamentos ficaram estipuladas em 10^7, 10^5 e 10^3 células/g de ração.

Cada ração experimental foi armazenada em pote plástico, identificado e estocado em sala climatizada, a uma temperatura de 22°C. Este procedimento foi repetido quinzenalmente no decorrer do experimento.

Diariamente, foram anotadas as concentrações de oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T) e condutividade elétrica, por meio de aparelho digital YSI modelo 85. O pH foi medido com aparelho digital YSI modelo 60. Os níveis de amônia total e nitrito foram medidos semanalmente, por meio de kits colorimétricos.

Foram utilizados 12 tanques de formato cilíndrico-cônico (cones), com volume útil de 80 litros. Na porção inferior de cada cone, foi adaptado um terminal coletor de fezes rosqueável, ligado a um registro hidráulico. A água, procedente de poço artesiano, foi fornecida pela porção superior dos cones, por torneiras reguladas para renovação de aproximadamente 5% do volume total/cone/ hora.

Foram efetuadas duas pesagens. A pesagem inicial compreendeu a amostragem de 30 peixes, que foram anestesiados com benzocaína e pesados individualmente com balança digital (FILIZOLA, MF-3), com 0,5g de precisão, sendo a média e o desvio padrão atribuídos para todos os tratamentos. Por tanto, cada cone recebeu 17 peixes com peso médio individual de 15,11 ± 0,23 g, resultando em biomassa inicial de 257g e densidade de 4,7 animais/litro.

A pesagem final foi efetuada no sexagésimo dia de experimento. Determinou-se a biomassa para cada unidade experimental pela soma dos pesos de cada peixe e sua divisão pelo número total de indivíduos pesados.

Os tambaquis foram submetidos a jejum no primeiro dia de experimento. A partir do segundo dia, os peixes representantes de cada tratamento foram alimentados com suas respectivas rações contendo óxido de cromo (Cr_2O_3) 0,5%.

Os animais foram alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 horas). Após 30 minutos de cada período alimentar, as sobras de ração e fezes que decantaram foram purgadas por descarga pelo registro hidráulico. Somente então foram rosqueados os terminais para a coleta de fezes.

As unidades experimentais foram lavadas no trigésimo dia de experimento, sem a retirada dos peixes. Para tanto, o fluxo de entrada de água dos cones foi

aumentado concomitantemente à abertura do registro de água dos mesmos. Procedeu-se a lavagem das paredes com esponja.

Após a primeira semana de experimento, foi iniciada a coleta das fezes pelo método de decantação, seguindo a metodologia de Cho *et al.*,1985. As fezes coletadas foram homogeneizadas e congeladas em placas de Petri, onde foram liofilizadas e analisadas bromatologicamente.

A determinação do coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e proteína bruta dos ingredientes das rações seguiu a metodologia de Cho *et al.*,(1985) e Cho *et al.*, (1987). A análise da determinação da concentração de óxido de Cromio III nas amostras foi realizada por método colorimétrico, conforme metodologia descrita por Furukawa & Tsukahara (1966).

3.1 Digestibilidade aparente de nutrientes (CDAn) e energia (CDAeb)

$$CDA_{n/eb} = 100 \times 1 - \left(\frac{(Cr2O3\ dieta) \times \%\ f_{n/e}}{(Cr2O3\ fezes) \times \%\ r_{n/e}} \right)$$

Sendo:

CDAn/eb = Coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes e energia;

Cr2O3 dieta = % de óxido de cromio III na ração;

Cr2O3 fezes = % de óxido de cromio III nas fezes;

% f n/e = % de nutriente ou energia nas fezes;

% r n/e = % de nutriente ou energia na ração.

3.2 Digestibilidade total (DT)

$$DT = 100 - 100 \times \left(\frac{\%\ Cr2O3\ na\ ração}{\%\ Cr2O3\ fezes} \right)$$

3.3 Energia digestível (ED)

ED = Ed - [(Ef x Id)If]

Sendo:

Ed = energia na dieta;

Ef = energia nas fezes;

Id = indicador na dieta;

If = indicador nas fezes.

3.4 Digestibilidade do ingrediente

CDAingr = CDAteste+ ((1-s)Dr/sDi) (CDAteste – CDAcontrole)

Sendo:

CDAingr = CDA do ingrediente testado

1-s = % da ração controle na ração teste

Dr = % do nutriente da ração teste

S = % do ingrediente teste na ração

Di = % do nutriente do ingrediente teste

CDAteste = CDA da ração teste

CDAcontrole = CDA da dieta controle

Foram determinadas as seguintes variáveis de desempenho produtivo: ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de crescimento relativo (TCR).

a) Ganho de peso (GP)

GP = Pf - Pi

Sendo:

Pf = peso final (g);

Pi = peso inicial (g).

b) Taxa de crescimento específico (TCE)

TCE (%) = 100 x [(lnWt – ln W0)]/t

Sendo:

Wt = peso no tempo final (g);

W0 = peso no tempo inicial (g).

t = tempo de duração do experimento em dias

c) Taxa de crescimento relativo (TCR)

TCR (%) = 100 x (Pf - Pi)/Pi

Sendo:

Pf = peso final (g);

Pi = peso inicial (g).

d) Conversão alimentar aparente (CAA)

CAA = Rf / P

Sendo:

Rf = quantidade de ração fornecida (g)

P = peso (g)

Por meio da coleta aleatória de dez peixes procedentes do estoque utilizado para configurar os tratamentos, e de seis peixes de cada unidade experimental, foram obtidos material biológico inicial e final para a análise de composição corporal. Os tambaquis foram separados em sacos plásticos e acondicionados em congelador, onde permaneceram por período de 24 horas, para posterior trituração, liofilização e quantificação dos principais componentes estruturais do corpo.

O experimento foi configurado por quatro tratamentos, cada qual com três repetições, levando em consideração os níveis de inclusão bacteriana na ração teste. O experimento foi realizado em um período de 60 dias, sendo as coletas de fezes realizadas em intervalos de 4 horas.

Os valores das repetições do coeficiente de digestibilidade aparente das diferentes dietas experimentais, das variáveis de desempenho produtivo e da análise corporal, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) one way, com nível de significância de 5%, pelo software STATISTICA® (Statisoft, 1995). Foi aplicado o teste de Tukey ($p<0,05$) para a verificação de diferenças estatísticas entre os resultados obtidos dos tratamentos.

4. Resultados

Os valores médios dos parâmetros monitorados de qualidade da água durante o experimento não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, e estão representados na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água monitorados.

Parâmetro	Unidade de medida	Tratamentos			
		Controle	10^3 UFC	10^5 UFC	10^7 UFC
OD	mg/l	4,8± 0,1	5,0± 0,0	5,1± 0,1	5,1± 0,2
Temperatura	°C	27,5± 0,4	28,1± 0,4	27,0± 0,4	27,3± 0,2
pH	-	5,9± 0,3	6,1± 0,3	5,8± 0,5	6,0± 0,5
Condutividade	µS.cm2	19,0± 0,5	18,0± 0,5	20,0± 0,8	18,0± 0,3
Amônia total	mg/l	0,3± 0,0	0,1± 0,0	0,3± 0,0	0,2± 0,0
Nitrito	mg/l	0,02± 0,0	0,01± 0,0	0,02± 0,0	0,02± 0,0
CO2	mg/l	0,9± 0,2	0,8± 0,1	0,8± 0,2	1,0± 0,1

UFC: unidade formadora de colônia

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) da matéria seca e dos nutrientes das rações com níveis crescentes de inclusão bacteriana estão representados na Tabela 17.

Tabela 17 - Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das rações contendo níveis crescentes de inclusão da linhagem bacteriana TR9 para juvenis de tambaqui.

Nutriente	CDA (%) dos nutrientes das Rações			
	Controle	10^3 UFC	10^5 UFC	10^7 UFC
MS	70,0±1,9	70,2±0,7	69,7±1,8	71,0±0,9
EE	97,4±0,2	98,1±0,4	97,3±0,2	97,5±0,2
PB	90,1±1,2	90,1±0,9	90,9±1,2	90,6±0,7
CNE	69,6±7,8	63,6±6,4	61,3±7,6	67,0±0,0
FDN	46,5±1,9	47,1±3,2	45,6±2,5	49,1±1,9
LIG	28,3±2,3	30,3±0,8	31,0±1,3	30,0±2,4
CEL	28,1±1,8	3,0±0,5	27,2±2,4	28,0±1,7
HCEL	11,0±4,7	6,7±2,0	8,3±1,7	9,1±2,2

MS: matéria seca; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; CNE: carboidrato não estrutural; FDN: fibra em detergente neutro; LIG: lignina; CEL: celulose; HCEL: hemicelulose.

Não houve diferença estatística entre os valores médios dos CDAs dos nutrientes das rações, conforme o aumento do nível de inclusão bacteriana. Os CDAs da PB apresentaram valor na casa de 90% em todos os níveis de inclusão bacteriana testados.

Dentre os nutrientes submetidos aos CDAs, apresentaram maiores variações os de CNE e HCEL, cujos valores médio, mínimo e máximo foram de 61,3% e 69,6%

e de 6,7 e 11,0% respectivamente. Foram registradas poucas variações para os CDAs de MS, EE, FDN, LIG e CEL, cujos valores médios, mínimos e máximos foram de 69,7 e 71,0%, 97,3 e 98,1% e 45,6 e 49,1% respectivamente.

4.1 Variáveis de Desempenho Produtivo

Os diferentes níveis de inclusão da linhagem bacteriana TR9 administrados na ração não causaram diferenças significas nas variáveis de desempenho produtivo analisadas ao final de sessenta dias de experimento Tabela 18.

Tabela 18 - Valor médio e desvio padrão das variáveis de desempenho produtivo.

Parâmetro	Ração			
	Controle	10^3 UFC	10^5 UFC	10^7 UFC
GP	201± 22	164 ± 25	196 ± 26	195 ± 19
TCE	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
TCR	78 ± 9,0	64 ± 10	76 ± 10	76 ± 15
CAA	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,4

O GP e a CAA obtidos das médias entre os tratamentos foram respectivamente de 189 g e 1,9 g/g de ração. O TCE e TCR obtidos das médias entre os tratamentos foram respectivamente de 0,9 e 73,5.

4.2 Composição corporal

Os resultados da análise da composição corporal dos tambaquis que foram submetidos aos tratamentos com níveis crescentes de inclusão da linhagem bacteriana TR9 em ração composta de TSM a 30% estão disponibilizados na Tabela 19.

Tabela 19 - Composição corporal de tambaquis juvenis alimentados com concentrações crescentes da linhagem bacteriana TR9 inoculadas em ração TSM30%.

Tratamento	100% de Matéria Seca			
	UM	PB	EE	CZ
Inicial	80,5±2,0a	55,3±0,5 a	5,3±0,2 a	20,4±0,6 a
Controle	71,5±1,0b	52,8±3,4 a	20,1±3,4 b	13,2±1,9 b
10^3 UFC	71,5±1,4 b	50,6±1,1 a	22,8±2,9 b	14,7±2,1 b
10^5 UFC	69,6±5,2 b	51,6±1,9 a	21,2±0,7 b	13,1±1,8 b
10^7 UFC	71,8±1,8 b	50,4±1,9 a	23,4±6,8 b	12,5±2,9 b

UFC: Unidade Formadora de Colônia
Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

As amostras de peixes que constituíram os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas de composição corporal para nenhum nutriente analisado.

As amostras de peixes que constituíram os tratamentos e a amostra inicial apresentaram diferenças estatísticas de composição corporal para UM, EE e CZ.

As amostras de peixes que constituíram os tratamentos e a amostra inicial não apresentaram diferenças estatísticas de composição corporal para a PB.

5. Discussão

Os parâmetros monitorados de qualidade da água apresentaram valores médios considerados adequados para a criação de peixes (Boyd, 1982), e estiveram dentro da faixa de conforto para tambaquis (Ismiño-Orbe, 1997; Aride,1998; Araújo-Lima & Goulding, 1997).

Mesmo não sendo monitorada a dinâmica de colonização bacteriana nas unidades experimentais, visualmente não foi formada camada de biofilme bacteriano em suas paredes, fato que poderia alterar a qualidade da água dos experimentos.

A alimentação de peixes desempenha importante função na determinação da qualidade da água e no impacto ambiental dos efluentes produzidos pelos peixes cultivados. A utilização de dietas balanceadas de mínimo custo e o adequado manejo alimentar são dois importantes requisitos para o sucesso na produção sustentável de peixes (Furuya, 2007).

Em experimentos de digestibilidade, um fator que poderia influenciar nos parâmetros de qualidade da água, e também nos próprios valores de CDAs, refere-se aos resíduos alimentares e parcela das fezes que com o passar do tempo vão-se acumulando nas paredes das unidades experimentais. Como o presente trabalho trata de inoculação bacteriana, é prudente também considerar a formação de biofilme nas paredes das unidades experimentais. A promoção da limpeza dos cones no meio do período experimental serviu como atenuante para possíveis alterações.

A igualdade dos CDAs entre os tratamentos com concentrações crescentes da bactéria TR9 demonstrou que tal linhagem, nas condições experimentais a que foi submetida, não apresentou potencialidade para ser utilizada na quebra de componentes fibrosos da ração. Dentre os possíveis fatores para tal, considerando a linhagem utilizada como sendo eficiente produtora de enzimas fibrolíticas, destaca-se a ocorrência de baixas concentrações bacterianas, ou a ausência das mesmas.

Bogut *et al,* (1998) utilizatram *Streptococcus faecium* como probiótico para carpa, *Cyprinus carpio*, e detectaram decréscimo em suas densidades. Da mesma forma, houve o decréscimo de uma potência no número de bactérias heterotróficas em intestinos de molinésia (*Poecilia reticulata*) em um período de 90 dias, durante os

quais as concentrações de 10^6 e 10^8 células/g de ração promoveram sobrevivência e crescimento satisfatórios (Ghosh *et al*., 2008).

Os testes *in vitro* produzem resultados mais esclarecedores quanto aos possíveis modos de ação e estratégias de competição entre bactérias, entretanto, os critérios em que candidatos a probióticos são aprovados não são os melhores preditores para suas efetividades *in vivo* (Vine, 2004). Um deles refere-se à própria habilidade de adesão ao muco entérico e à superfície da parede intestinal como requisitos necessários para a bactéria se estabelecer no intestino, característica desejável em probióticos (Olsson, *et al.,* 1992; Onarheim e Raa, 1990).

A adesão pode ser classificada como não específica, com base em fatores físico-químicos; ou pode ser considerada específica, envolvendo então moléculas de adesina e receptores de moléculas nas células epiteliais (Salminen *et al.,* 1996). Por outro lado, a bactéria usada pode ser transiente, e esses microrganismos podem ser igualmente eficientes àqueles com capacidade de colonização, se administrados em doses elevadas, continuamente ou em intervalos (Gournier-Chateau *et al.,* 1994).

As celulases e hemicelulases apresentam grande potencial de aplicação na indústria de ração e suplementos para animais (Bhat, 2000). No entanto, as celulases atuam com maior eficiência pelo sinergismo de suas enzimas, o que aumenta a velocidade de degradação do substrato (Klyosov, 1995). Já a xilanase, uma das principais hemicelulases, é regulada por fenômenos complexos, que variam de acordo com a espécie (Kulkarni *et al*., 1999).

As concentrações de nutrientes para o crescimento de bactérias celulolíticas passam pela avaliação de nitrogênio e fósforo, além de macro e micro minerais e várias vitaminas (Lynd *et al.,* 2002). Estes elementos estavam contidos no meio CMC utilizado para a caracterização das linhagens produtoras de celulase, mas dificilmente os mesmos nutrientes e suas exatas concentrações estariam compondo as rações, sugerindo que a deficiência em nutrientes possa ser um empecilho na quebra da celulose contida nas mesmas.

A síntese de enzimas é facilmente reprimida quando qualquer outra fonte de carbono de fácil metabolização é liberada no meio de crescimento (Kulkarni *et al.* 1999). Entretanto, os valores de CDAs aqui encontrados corroboram os valores do

experimento de inclusão crescente da TSM, e os CDAs da ração TSM 30% apresentaram resultados semelhantes.

Não foi verificada mortalidade durante o período de sessenta dias de experimento, tampouco foi constatada a presença de peixes com sintomas de doenças. E da mesma forma que os CDAs das rações para os juvenis de tambaqui não diferenciaram entre si, as variáveis de desempenho produtivo não foram influenciadas pelos níveis de inclusão bacteriana.

Cabe ressaltar que as variáveis de desempenho produtivo foram aplicadas para revelar se determinado tratamento surtiu algum efeito sobre os peixes. Ou seja, a densidade aqui utilizada não fornece subsídios teóricos para ser comparada com trabalhos de campo, como realizados em viveiros e tanques-rede (Gomes *et al.,* 2006). Por outro lado, a utilização de baixas densidades em experimento de digestibilidade pode acarretar em dominância de alguns peixes maiores dentro das unidades experimentais em relação ao consumo de alimento (Oishi, 2007).

A densidade de peixes utilizada no presente trabalho pode ser considerada elevada para o volume utilizado, em se tratando de análise das variáveis de desempenho produtivo. Tal fato refletiu no aumento de deposição de gordura corporal dos peixes, atribuída ao espaço reduzido que restringiu a movimentação dos animais, induzindo-os a reduzirem o gasto de energia gerada pela fonte de lipídeos, já que seu ganho é decorrente da elevação de seus níveis em rações (Oishi, 2007; Rojas e Verdegem, 1994), que não foi o caso das rações confeccionadas para este experimento.

6. Conclusão

A inoculação de níveis crescentes da linhagem bacteriana TR9 não causou efeitos sobre os CDAs, variáveis de desempenho produtivo e composição corporal de juvenis de tambaqui alimentados com ração contendo TSM 30%.

7. Referências Bibliográficas

Araujo-Lima, C., and M. Goulding. 1997. So fruitful a fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazons' tambaqui. Columbia University Press, New York.

Aride, P.H.R. 1998. Efeito do pH nos parâmetros hematológicos e no ganho de peso de Colossoma macropomum (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 52 pp.

Bairagi A.; K Ghosh, S.; Sen, S. K.; Ray, A. K.2004. Evaluation of the nutritive value of Leucaena leucocephala leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria Bacillus subtilis and Bacillus circulans in formulated diets for rohu, Labeo rohita (Hamilton) fingerlings. Aquaculture Research, 35, 436-446.

Béguin, P.; Aubert, J. P. 1994. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiology Review 13(1), 25-58.

Belal, E. H. I. 2008. Evaluating fungi-degraded date pits as a fed ingredient for Nile tilapia Oreochromis niloticus. Aquaculture Nutrition, 14, 445-452.

Bhat, 2000 Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, 18, 355-383.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic sistems. Trends Biotechnol., Amsterdan, v.3, p.286-290.

Bijlani,R.L. 1985. Dietary fibre: consensus and controversy. In Progress in Food and Nutritions Sciense,9:343-93.

Bogut I., Milakovic Z., Brkic S. & Zimmer R. (1998) In£uence of probiotic (Streptococcus faecium M74) on growth and content of intestinal micro£ora in carp (Cyprinus carpio). CzechJournal of Animal Sciences 43, 231^235.

Boyd, C.E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Amsterdam: Elsevier Science, 317p.

Carré, B.; Delrouet, L.; Leclercq, B. 1990. The digestibility of cell-wall polysaccharides from wheat (bran or whole grain), soybean meal, and while lupin meal in cockrels, muscovy ducks, and rats. Poultry Science, Champaign, 69,(4), 623-633.

Cho, C. Y. 1987. La energia em la nutrición de los peces. In: Espinosa de los Monteros, J.; Labarta, U. (Ed.) Nutrición en Acuicultura II. Madrid,.

Cho, C. Y; Cowey, C.B.; Watanabe, T. 1985. Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development. Otawa, IDRC. 154p.

Francis, G.; Makkar, HPS; Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquacultura, Amsterdam, n. 3/4, p. 197-227.

Furukawa, A.; Tsukawara, H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as na index in the study of digestibility of fish feed. Bull. Of the Jap. Soc. Sci. Fisheries, 32: 502-506.

Furuya, W. M. 2007. Redução do impacto ambiental por meio da ração. In: Palestra VII Seminário de Aves e Suínos – AcesuiRegiões. III Seminário de Aqüicultura, Maricultura e Pesca. Anais... Belo Horizonte-MG. p. 121-139..

Ghosh, S. Sinha, A. Sahu, C. 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes.Aquaculture Nutrition, 14, 289-299.

Gomes, L.C. ; Chagas, E.D.; Martins Junior, H; Roubach, R ; Ono, E; Lourenço, J.N.P. 2006 . Cage culture of tambaqui (Colossoma macropomum) in a central amazon floodplain lake. Aquaculture, v. 253, n. 1-4, p. 374-384

Gournier-Chateau, N., Larpent, J. P., Castellanos, I., Larpent, J. L., 1994. Les Probiotiques en Alimentation Animale et Humaine. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 192 pp.

Hall, M.B. 2001. Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows, In: Simpósio internacional em bovines de leite, Lavras: UFLA-FAEPE.

Honda, E.M.S. 1974. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação do tambaqui, Colossoma bidens. Acta Amazonica, v.4, p.47-53.

Ismiño-Orbe, R.A. 1997. Excreção e efeito da amônia sobre o crescimento do tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1818). 29p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

Jerger, D. E., D. A. Dolenc, and D. P. Chynoweth. 1982. Bioconversion of woody biomass as a renewable source of energy. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12:233-248.

Jung, H.G. Forages lignins and their effects on fiber digestibility. 1989.Agronomy Journal, 81, 33-38.

Klyosov, A. A. 1995. Biomass conversion with cellulases. In: Industrial Enzime Engineering. Harward University, 1, Thiemann, J.E., Xavier, M.S.S.P., Colen,

g., Guia, M.M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. In Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo (J.S. Furtado, coord.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185.

Kulkarni, N.; Shebdye, A.; RAO, M. 1999. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. FEMS Microbiology. Reviews, 23, 411-456,.

Larbier, M.; Leclercq, B. .1992. Nutrition and Feeding of Poultry. Notthingham: Nottingham University Press,.

Lynd, R.L.; Weimer, P.J.; Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology Microbiology and Molecular Biology Reviews, December, p. 739, Vol. 66, No. 4

Meurer, F.; Hayashi, C.;.Boscolo, W.R.; Soares, C.M. 2003. Fontes de fibra bruta em dietas de alevinos de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus). Acta Scientiarum, 22, 689-694.

Oishi, C. 2007. Uso de resíduo da castanha da amazônia (Bertholletia excelsa) como ingrediente alternativo em rações para juvenis de tambaqui (Colossoma macropomum). Dissertação de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 63pp.

Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (Scophthalmus maximus)- and dab (Limanda limanda)-associated bacteria with inhibitory effects against Vibrio anguillarum. Appl. Environ. Microbiol. 58:551–556.

Onarheim, A. M., and J. Raa. 1990. Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa in sea-water fish, p. 197–201. In R. Lésel (ed.), Microbiology in poecilotherms. Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms.

Pezzato, L.E., Miranda, E.D.; Furuya, W.M.; Pinto, L.G.Q.; Barros, M.M; Rosa, G.J.M. 2002. Diâmetro do ingrediente e a digestibilidade aparente de rações por duas espécies de peixes tropicais. Acta Scientiarum, Maringá, v. 24, n. 4, p. 901-907.

Prade, R.A. 1995. Xylanases: from biology to biotechnology. Biotechnol Genet. Eng. Rev., Newcastle, v.13, p.101-131.

Ramos, L.P. 2003. The chemistry involved in the stream treatment of lignocellulosic materials. Quimica nova, 26, 863-871.

Rojas, J. V. U.; Verdegem, M. C. J. 1994. Effects of the protein:energy ratio in isocaloric diets on growth of Cichlasoma managuense (Günther, 1869). Aquaculture, 25, 631-637.

Silva, D.J. 1990. Determinação da celulose. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 2.ed. p.20-22.

Silva, J.A.M.; Filho. M. P., Oliveira-Pereira, M. I. 2003. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, Colossoma macrompum (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal, R. Bras. Zootec., v.32, n.6, p.1815-1824.

Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1:45–70.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2ªed. Cornell: Cornell University Press. 476p.

Vine, N.G. 2004. TOWARDS THE DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR THE SELECTION OF PROBIOTICS IN MARINE FISH LARVICULTURE. PhD Thesis, Rhodes University, pp. 94.

Wilkie, K. C. B., and S.-L. Woo. 1977. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. Carbohydr. Res. 57:145–162.

Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. 3a ed. Prentice-Hall, Englewood Clifes, NJ. 662p.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo