

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

MILTON CÉZAR DE MOURA

Bacillus cereus var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 no cultivo de tilápia do
Nilo da linhagem GIFT

Toledo

2011

MILTON CÉZAR DE MOURA

Bacillus cereus var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 no cultivo de tilápia do
Nilo da linhagem GIFT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura.

Orientador: Prof. Nilton Garcia Marengoni, *Ph.D.*

Toledo

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

MILTON CÉZAR DE MOURA

Bacillus cereus var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 no cultivo de tilápia do
Nilo da linhagem GIFT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Nilton Garcia Marengoni, *Ph. D.*
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Nelson Massaru Fukumoto
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Aprovada em: _____ de 2011.

Local de defesa: Auditório da Unioeste/*Campus* de Toledo.

DEDICATÓRIA

*Ao amor da minha vida, a
minha querida esposa Faline.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar a minha vida.

Ao Professor Nilton Garcia Marengoni *PhD*, orientador, por ter acreditado em meu potencial e ter me oportunizado esta conquista.

Aos professores Dr. Robie Allan Bombardelli e Dr. Nelson Massaru Fukumoto pela contribuição no Exame Geral de Qualificação e participação na Defesa da Dissertação.

Ao Professor Renato Tratch, pelas diversas oportunidades de crescimento que tem me propiciado e pela grande amizade.

À minha família, por ser o grande esteio da minha vida.

Aos colegas Ilson Mahl e Daniele Menezes Albuquerque, pela amizade e companheirismo durante todos os experimentos e análises.

Ao Grupo de Estudos em Tilapicultura (GET), pelo apoio e trabalho em equipe.

Aos professores do Programa de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), pelo conhecimento adquirido.

Aos colegas de trabalho da Pontifícia Universidade Católica do Paraná *campus* Toledo (PUCPR/Toledo), por sempre terem me apoiado.

Ao Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental, pela concessão do local dos experimentos.

À empresa Algomix Agroindustrial Ltda, pelo fornecimento gratuito da ração utilizada nos experimentos.

À PUCPR/Toledo, pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia.

À Unioeste *campus* de Marechal Cândido Rondon pela disponibilização do Laboratório de Nutrição Animal.

RESUMO GERAL

O presente objetivou avaliar a utilização dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados à dieta para juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), a fim de verificar a colonização do epitélio intestinal e água do cultivo, a influência sobre a microflora bacteriana, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal, composição centesimal e os parâmetros da qualidade da água. Realizaram-se dois experimentos: cultivo em tanques rede com indivíduos jovens por 127 dias (E₁) e cultivo em viveiros com indivíduos adultos por 201 dias (E₂). Utilizou-se no Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (CPAA/Toledo-PR), vinte viveiros escavados com 8,4 m³ de água e tanques rede com volumes úteis de 0,175 m³. Os peixes de cada experimento foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos com cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos de rações comerciais para cada fase de cultivo, adicionadas de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação dos dois probióticos (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP). No experimento E₁, verificou-se que os probióticos contendo *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 colonizaram o epitélio intestinal dos peixes e a água do cultivo, mas não influenciaram os demais parâmetros analisados ($p > 0,05$). A sobrevivência variou de 80% a 90% e a conversão alimentar de $1,69 \pm 0,29$ a $1,96 \pm 0,94$ para os tratamentos BS e SP. Os níveis de PB variaram de 13,08% a 13,78% para BC+BS e BC e o índice vicerosomático variou de 9,71% a 10,9% para BC+BS e BS, respectivamente. No experimento E₂, observou-se também, que os probióticos colonizaram o intestino e a água do cultivo, mas não influenciaram os demais parâmetros ($p > 0,05$). A temperatura média da água ficou em 20,7°C, estando abaixo da faixa ótima para a espécie. O peso e o crescimento específico dos peixes apresentaram variação de 324,81 g dia⁻¹ e 398,51 g dia⁻¹; e 0,62 % dia⁻¹ a 0,73 % dia⁻¹, respectivamente para BC e BS. A conversão alimentar variou de $2,40 \pm 0,24$ a $2,92 \pm 0,41$ para BS e BC e a sobrevivência variou de 84,5% a 86% para BC e SP. Os probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 utilizados individualmente e combinados realizaram a colonização do epitélio intestinal dos peixes e da água do cultivo, contudo, não influenciaram a microflora bacteriana intestinal, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e centesimal e os parâmetros de qualidade da água.

Palavras chave: desempenho zootécnico, microflora intestinal, probióticos, *Oreochromis niloticus*

GENERAL ABSTRACT

This study aimed to evaluate the use of probiotics *Bacillus cereus* var. Toyo and *Bacillus subtilis* C-3102 added to the diet for juvenile Nile tilapia strain of GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) in order to verify the colonization of the gut epithelium and water, the influence on the bacterial microflora, the production performance, the indexes of body composition, the chemical composition and parameters of water quality. Two experiments were conducted: culture in cages with young individuals by 127 days (E₁) and culture in ponds with adults by 201 days (E₂). There was used the Center for Environmental Research in Aquaculture (CPAA/Toledo-PR) twenty ponds with 8.4 m³ of water and cages with useful volumes of 0.175 m³. The fishes from each experiment were randomly assigned to four treatments with five replicates. The treatments consisted of diets for each phase of commercial cultivation, added 0.5% *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0.5% *B. subtilis* C-3102 (BS), 0.5% of the combination of two probiotics (BC+BS) and without addition probiotics (SP). In experiment E₁, it was found that *B. cereus* var. Toyo and *B. subtilis* C-3102 colonized the gut epithelium of fishes and water culture, but did not influence the other parameters (P > 0.05). Survival ranged from 80% to 90% and feed conversion of 1.69 ± 0.29 to 1.96 ± 0.94 for treatments BS and SP. The CP levels ranged from 13.08% to 13.78% for BC and BC+BS and vicerosomal index ranged from 9.71% to 10.9% for BS and BS+BC, respectively. In experiment E₂ was also observed that the probiotics colonize the intestines and water cultivation, but did not influence the other parameters (p > 0.05). In this experiment, the indexes of production performance were influenced by the average temperature of the water that stood at 20.7°C and is below the optimal range for the species. Weight and specific growth of the fishes ranged from 324.81 g day⁻¹ and 398.51 g day⁻¹, and 0.62% day⁻¹ to 0.73% day⁻¹, respectively, for BC and BS. Feed conversion ranged from 2.40 ± 0.24 to 2.92 ± 0.41 for BS and BC and survival ranged from 84.5% to 86% for BC and SP. The probiotics *B. cereus* var. Toyo and *B. subtilis* C-3102 used individually and in combination colonized the gut epithelium of fishes and cultivation water, however, did not influence the gut microflora, the production performance, the indexes of body composition, the chemical composition and parameters of water quality.

Keywords: gut microflora, *Oreochromis niloticus*, probiotics, production performance

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** Probióticos para diversos parâmetros analisados em tilápia, alterado de Dimitroglou et al. (2011) e Denev et al. (2009)17
- Tabela 4.1** Composição das rações comerciais para alevinos de tilápia do Nilo de acordo com as fases de cultivo, adaptada de Algomix[®] Agroindustrial Ltda.....29
- Tabela 4.2** Taxa de arraçoamento para tilápia do Nilo em função da temperatura da água e peso vivo (PV)29
- Tabela 4.3** Valores médios e desvios padrões de contagens de mesófilos totais e coliformes totais das amostras de intestino e água, oriundos do cultivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações adicionadas de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)32
- Tabela 4.4** Valores médios e desvios padrões dos parâmetros de desempenho zootécnico no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)36
- Tabela 4.5** Valores médios e desvios padrões dos índices de composição corporal e índices de composição centesimal de juvenis de tilápia do Nilo GIFT, submetidas às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)37
- Tabela 5.1** Valores médios e desvios padrões dos parâmetros de desempenho zootécnico durante o cultivo de tilápia do Nilo submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)51

Tabela 5.2 Valores médios e desvios padrões dos índices víscerosomático, hepatosomático, gordura visceral e rendimento de filé de tilápias do Nilo GIFT, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)52

Tabela 5.3 Valores médios e desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água durante o período experimental no cultivo de tilápia do Nilo, linhagem GIFT submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1** Médias da microflora intestinal para mesófilos totais (a) e coliformes totais (b), durante o cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)33
- Figura 4.2** Valores médios de mesófilos totais (a) e coliformes totais (b) na água, durante os meses de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)33
- Figura 4.3** Valores médios dos parâmetros de qualidade da água para condutividade (a), transparência e precipitação (b), oxigênio dissolvido (c), pH e temperatura (d), observados durante o período experimental34
- Figura 5.1** Isolamento dos probióticos (A) *Bacillus cereus* var. Toyoi (1000x) e (B) *Bacillus subtilis* C-3102 (1000x) a partir amostras intestinais de juvenis de tilápia do Nilo submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS) 48
- Figura 5.2** Médias da microflora intestinal para mesófilos totais (a) e coliformes totais (b), durante os meses de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)49
- Figura 5.3** Média da microflora da água para mesófilos totais (a) e coliformes totais (b), durante os meses de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP)50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 A tilápia do Nilo	15
3.2 A produção de tilápias	15
3.3 Probióticos na aquicultura	16
3.3 Referências	19
4. <i>Bacillus cereus</i> VAR. TOYOI E <i>Bacillus subtilis</i> C-3102 PARA JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO EM TANQUES REDE	24
4.1 Resumo	24
4.2 Abstract	25
4.3 Introdução	26
4.4 Material e métodos	27
4.5 Resultados e discussão	32
4.4 Conclusão.	37
4.5 Referências	38
5 <i>Bacillus cereus</i> VAR. TOYOI E <i>Bacillus subtilis</i> C-3102 NO CULTIVO DE TILÁPIA DO NILO DA LINHAGEM GIFT EM VIVEIROS	42
5.1 Resumo	42
5.2 Abstract	43
5.3 Introdução	44
5.4 Material e métodos	45
5.5 Resultados e discussão	48
5.6 Conclusão	53
5.7 Referências	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes são extremamente importantes na alimentação, pois constituem fonte de proteína de alto valor biológico, sendo em alguns países da Europa e Ásia a fonte de proteína de origem animal mais consumida, cujo teor protéico nas diferentes espécies oscila entre 15 e 20% (GERMANO et al., 2008).

Desta forma, a aquicultura é considerada pela Organização das Nações Unidas como atividade estratégica para a segurança alimentar sustentável do planeta, pois é capaz de fornecer alimento proteico de alta qualidade e ainda gerar empregos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (FAO, 2006).

No Brasil a aquicultura tem um papel de destaque no crescimento da produção de pescado. Somente a piscicultura teve uma elevação de 60,2% entre os anos de 2008 e 2009 em comparação com o ano de 2007. A produção de tilápia chegou a 132 mil toneladas/ano, sendo o carro chefe da atividade aquícola e representa 39% do total de pescado cultivado (BRASIL, 2011).

A criação de tilápia do Nilo apresenta uma grande vantagem sobre as espécies nativas em relação ao conhecimento técnico e científico disponível, tanto no campo da biologia quanto de tecnologias de produção. Além disso, a tilápia tem se destacado devido, principalmente a qualidade de sua carne, apreciada em nível mundial, e a facilidade que apresenta para a criação em diferentes sistemas de produção (FITZSIMMONS, 2009).

Na tilapicultura utilizam-se diversos sistemas de produção destacando-se os sistemas semintensivos e intensivos, onde se mantêm altas densidades de populações de peixes em áreas limitadas o que pode favorecer, caso não sejam utilizadas boas práticas de manejo, o surgimento de estresse nos animais e com isso a possibilidade do surgimento e propagação de doenças com perdas econômicas significativas (PAVANELLI et al., 2008).

Segundo El-Sayed (2006), dentre as doenças, as de origem bacteriana são as principais responsáveis pelas perdas na aquicultura comercial. Desta forma, a utilização de antibióticos é uma prática comum para o controle da proliferação de agentes bacterianos patogênicos, além disso, foram também muito utilizados adicionados a dieta como promotores de crescimento. Porém, no ano de 2006 a União Europeia ratificou a proibição da utilização de todos os antibióticos subterapêuticos como agentes promotores de crescimento na produção animal (DENEV et al., 2009).

Desta forma, isto estimulou uma série de pesquisas que buscam produtos não antibióticos, que possam auxiliar a saúde dos peixes e também melhorar o desempenho zootécnico. Entre as alternativas mais promissoras destacam-se os probióticos e os prebióticos (CABELLO, 2006).

Os probióticos são conhecidos como aditivos alimentares compostos de microrganismos vivos que melhoram o desempenho zootécnico e beneficiam a saúde dos animais. Estes microrganismos atuam estimulando a multiplicação de bactérias benéficas no ambiente intestinal ou na água em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, com isso, melhorando o equilíbrio da microflora (FÜLLER, 1989).

Diversos são os mecanismos de ação dos probióticos que incluem a competição por sítios de adesão e por nutrientes essenciais, a produção de compostos antagônicos contra patógenos, a estimulação e melhoria da resposta imune para resistência a doenças e o auxílio na digestibilidade e aproveitamento alimentar por meio da produção exógena de enzimas digestivas e de vitaminas (BALCÁZAR et al., 2006a e b; DIMITROGLOU et al., 2011).

Referências

- BALCÁZAR, J. L.; DECAMP, O.; VENDRELL D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 18, n. 2, p. 65-70, 2006a.
- BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006b.
- BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura** – Brasil 2008 - 2009. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2011. 100 p.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environment Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.
- DENEV, S. A.; STAYKOV, Y.; MOUTAFCHIEVA, R.; BEEV, G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. **International Aquatic Research**, v.1, n. 4, p. 1-29, 2009.
- DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D. L.; CARNEVALI, O.; PICCHIETTI, S.; AVELLA M.; DANIELS, C.; GÜROY, D. DAVIES, S. J. Microbial Manipulation to improve fish

health and production – A Mediterranean perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1-16, 2011.

EL-SAYED, A. M. **Tilapia culture**. London: Cabi, 2006. 277p.

FAO. **Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance**: Seoul, Republic of Korea, 2006. p. 13-16.

FITZSIMMONS, K. **Tilapia**: 2009 State of the industry report. WAS2010, San Diego, CA. Disponível em: <http://www.was.org/WasMeetings/Meetings/SessionAbstracts.aspx?Code=AQ2010&Session=31>. Acesso em: 06 de abril de 2011.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. A. F. Aspectos da qualidade do pescado de relevância para a saúde pública. **Higiene e Alimentação**, v. 12, n. 53, p. 30-37, 2008.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doença de peixes**: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3. ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2008.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados à dieta para juvenis de tilápia do Nilo GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), em dois experimentos: cultivo de indivíduos jovens com peso inicial de 0,34 g por 127 dias em tanques rede e cultivo de indivíduos adultos com peso inicial de 91,65 g por 201 dias em viveiros.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar durante as biometrias e ao término dos cultivos de tilápia do Nilo a colonização do intestino dos peixes pelos probióticos, a influência sobre a microflora bacteriana, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e centesimal e os parâmetros da qualidade da água dos viveiros.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é pertencente à Ordem Perciformes, família Cichlidae, oriundas do continente africano, sendo encontrada principalmente nas bacias dos rios Nilo, Níger, Tchade e nos lagos do centro-oeste. Foi introduzida em mais de 100 países em sua maioria das regiões tropicais e subtropicais, tanto para melhorar a produtividade pesqueira como para auxiliar o desenvolvimento da aquicultura (EL-SAYED, 2006). No Brasil é a espécie mais produzida, podendo ser encontrada em praticamente todo o território nacional, exceto nas regiões abrangidas pelas Bacias do Amazonas e Paraguai, onde seu cultivo não é permitido pela legislação ambiental vigente (BRASIL, 2011).

3.2 A produção de tilápias

A tilápia do Nilo foi introduzida no Brasil, em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (BEZERRA, 2009).

Atualmente, a tilápia é a espécie que ocupa o terceiro lugar entre os peixes mais utilizados em piscicultura no mundo, ficando atrás apenas das carpas e dos salmões (FAO, 2010).

No Brasil, a produção de tilápias cresceu significativamente nos últimos 20 anos chegando em 2007 a 132 mil toneladas (BRASIL, 2011).

A criação de tilápias em tanques rede, principalmente os de pequeno volume (1 a 4 m³), tem crescido muito em diversos países, inclusive no Brasil, podendo tornar-se o sistema mais importante em vários países que praticam aquicultura, pois de acordo com Beveridge (2004) este sistema apresenta algumas vantagens em relação à piscicultura tradicional como: menor investimento inicial, aproveitamento dos recursos aquáticos já disponíveis, maior controle da produção, eliminação dos problemas associados à reprodução excessiva e a facilidade no manejo e na despesca.

Segundo Müller (1990), a produção de uma tonelada de peixes em tanques rede, custa em torno de 30 a 40% menos, que produzir essa mesma quantidade de peixes em viveiros que exigem um investimento inicial maior.

As tilápias apresentam várias características favoráveis à criação, entre elas podem ser citadas altas taxas de crescimento, principalmente dos machos, menor conversão alimentar aparente, resistência a doenças, altas densidades de estocagem e baixa demanda de oxigênio dissolvido (BOYD, 2005; EL-SAYED, 2006).

3.3 Probióticos na aquicultura

O campo da *probiosis* surgiu como uma nova ciência com aplicações também na aquicultura, a fim de servir de alternativas a utilização subterápica de antibióticos. Os probióticos estão sendo desenvolvidos comercialmente para utilização juntamente com alimentos para os animais, na prevenção de infecções gastrointestinais, com ampla utilização na agropecuária (HONG et al., 2005).

Contudo, os estudos nesta área são relativamente recentes. Um dos pioneiros foi Kozasa (1986), que desenvolveu pesquisas com o microrganismo *Bacillus cereus* var. Toyoi onde observou que apesar de ser exógena a bactéria contribuía positivamente com a flora bacteriana intestinal de suínos, diminuindo a carga bacteriana patogênica e melhorando o desempenho. A partir daí, o assunto rapidamente despertou grande interesse da comunidade científica (GATESOUBE, 1999).

Gomez-Gil e Roque (1998) informam que a seleção de probióticos é muito crítica, porque microrganismos inadequados podem levar a efeitos indesejáveis no hospedeiro. Um probiótico ideal, independentemente da sua fonte deve ser capaz de estabelecer-se, colonizar e multiplicar-se no intestino hospedeiro.

O espectro da ação dos probióticos através de seus mecanismos e as condições que os tornam mais efetivos ainda são objetos de estudo. Contudo, sabe-se que a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas no ambiente intestinal dos animais, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais. Isso reforça os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro incluindo fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos (NAYAK, 2010).

De acordo com a característica de cada gênero a efetividade dos probióticos pode ocorrer de diversas formas como, por exemplo, produção de substâncias inibidoras a outros organismos patogênicos, competição por sítios de adesão na parede epitelial, competição por nutrientes, produção de enzimas digestivas que contribuem com a digestibilidade dos

alimentos, estímulo ao sistema imunológico e, no caso da aquicultura, atuar positivamente na qualidade da água (SAHU et al., 2008).

Diversos estudos realizados buscam testar diferentes microrganismos com potencial probiótico e entender quais as formas de ação de cada estirpe em relação a espécie de peixe a ser produzida. Verifica-se na Tabela 3.1 algumas pesquisas com microrganismos probióticos aplicados a tilápias.

Tabela 3.1 Probióticos para diversos parâmetros analisados em tilápia, alterado de DIMITROGLOU et al. (2011) e DENEV et al. (2009).

Probiótico	Parâmetro investigado	Espécie de peixe	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Resposta imune e desempenho zootécnico.	Tilápia do Nilo	Mesalhy et al. (2008)
<i>Enterococcus faecium</i> ZJ4	Resposta imune e desempenho zootécnico.	Tilápia do Nilo	Wang et al. (2008)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Resposta imune e resistência a doenças.	Tilápia do Nilo	Pirarat et al. (2006)
<i>Micrococcus luteus</i>	Resposta imune e resistência a doenças.	Tilápia do Nilo	Taoka et al. (2006)
<i>Micrococcus luteus</i> e <i>Pseudomonas</i> spp.	Desempenho zootécnico, eficiência alimentar e resistência a doenças.	Tilápia do Nilo	Abd El-Rhman et al. (2009)
<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus Acidophilus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Desempenho zootécnico e eficiência alimentar.	Tilápia do Nilo	Lara-Flores et al. (2003)
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Resposta imune, atividade respiratória, atividade bactericida do soro, adesão de neutrófilos lysozimas e percentual do hematócrito.	Tilápia do Nilo	Aly et al. (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inibição de potenciais bactérias nocivas, estímulo de bactérias benéficas, resposta imune não-específica, desempenho zootécnico e eficiência alimentar.	Tilápia híbrida (<i>Oreochromis niloticus</i> ♀ × <i>O. aureus</i> ♂)	He et al. (2009)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bifedobacterium bifedum</i> , <i>Streptococcus faecium</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Desempenho zootécnico e digestibilidade de nutrientes.	Tilápia do Nilo	Ghazalah et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> e <i>B. pumilus</i>	Desempenho zootécnico e proporção sexual	Tilápia vermelha (<i>Oreochromis</i> sp.)	Marengoni et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	Desempenho zootécnico e eficiência alimentar.	Tilápia do Nilo	El-Haroun et al. (2006).
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> e <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Desempenho zootécnico e eficiência alimentar.	Tilápia do Nilo	Zhou et al. (2009).

Os microrganismos mais utilizados em pesquisas para aquicultura incluem os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e espécies *Saccharomyces* (NAYAK, 2010).

O envolvimento de probióticos na nutrição, resistência a doenças e outras atividades benéficas em peixes aos poucos vão sendo conhecidos. Entre os inúmeros benefícios à saúde atribuídos aos probióticos a modulação do sistema imune é um dos benefícios mais comumente verificados. Os probióticos possuem potencial para estimular a imunidade sistêmica e local dos animais. Diferentes Probióticos, tanto monoespécies ou suplementação multiespécies, pode eventualmente, elevar a atividade fagocítica, do sistema complemento, de lisozimas, de explosão respiratória bem como a expressão de várias citocinas em peixes (DENEV et al., 2009).

Na aquicultura os probióticos são comercializados na forma de pó ou líquida, podendo ser ministrados pulverizados no alimento, adicionados a água de cultivo, na dieta artificial e em alimentos vivos. Antony e Philip (2006) alertam que os probióticos utilizados na aquicultura podem ser desativados ou não se tornarem disponíveis ao hospedeiro em função da exposição a altas temperaturas no processo de extrusão do alimento e também pela utilização de dosagem probiótica inadequada.

Nayak (2010) considera que, a maioria dos probióticos comerciais utilizados para animais terrestres já estão sendo usados em práticas de aquicultura. Embora, estes probióticos sejam exógenos, seu sucesso em práticas de aquicultura não pode ser negligenciado.

Dentre o grande número de produtos probióticos atualmente utilizados, a maioria são aqueles formadores de esporos, onde se destaca o gênero *Bacillus*. Disponíveis principalmente na forma de pó, estes produtos foram apresentados para impedir distúrbios gastrointestinais. Compreender a natureza do efeito probiótico tem sido um grande desafio, devido a maioria das espécies do gênero *Bacillus* serem microrganismos alóctones ao ambiente intestinal (BALCÁZAR et al, 2006).

Os probióticos do gênero *Bacillus* podem agir positivamente sobre os organismos cultivados, aumentando a sobrevivência e o crescimento, estimulando o sistema digestivo e o sistema imunológico, além de contribuir na melhoria da qualidade da água em termos de biorremediação (NAYAK, 2010).

De acordo com Hoa et al. (2000) a principal vantagem dos *Bacillus* sobre as bactérias ácido lácticas, na elaboração de probióticos, reside em sua capacidade de esporular, o que lhes

confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal, assim como, durante a elaboração, o transporte e o armazenamento das rações (GIL-TURNES et al., 1999).

Uma das espécies de *Bacillus* utilizada como probiótico é o *Bacillus cereus* var. Toyoi, originário do solo o qual não produz enterotoxinas diarréicas ou eméticas. Este probiótico promove a melhora do desempenho zootécnico para suínos, frangos e bezerras (ZANI et al., 1998; LÖHNERT et al., 1999; RICHTER et al., 1999) e realiza o controle de diarréias em suínos (ZANI et al., 1998). Na aquicultura este probiótico foi testado experimentalmente por Bagheri et al. (2008) para truta vermelha (*Onchorhynchus mykiss*) e verificaram que a utilização do probiótico melhorou o fator de condição, a taxa de crescimento específico e taxa de eficiência protéica.

Os mecanismos de ação dos probióticos têm sido amplamente abordados, porém, suas aplicações na aquicultura ainda não são consenso e necessitam de mais estudos. A função que cada espécie de microorganismo probiótico desempenha individualmente na saúde e na nutrição dos peixes, assim como, a forma como isso ocorre ainda são pouco compreendidas (DENEV et al., 2009)

Por estes motivos, as pesquisas nesta área são importantes e devem ser ampliadas, garantindo a segurança alimentar e a aplicação comercial dos probióticos para aquicultura.

3.3 Referências

ABDEL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A. E.; ADEL, M. E.; SHALABY, A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 175-180, 2009.

ALY, S. M.; AHMED, Y.; GHAREEB, A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 128-136, 2008.

ANTONY, S. P., PHILIP, R. Bioremediation in shrimp culture system. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v. 29, n. 3-4, p. 62-66, 2006.

BAGHERI, T.; HEDAYATI, S. A.; YAVARI, V.; ALIZADE, M., FARZANFAR, A. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given

diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 1, n. 8, p. 43-48, 2008.

BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

BEVERIDGE, M. C. M. **Cage aquaculture**. Oxford: Blackwell Publishing Company. 3. ed. 2004. 376p.

BEZERRA, J. W. S. **Tilápias: Biologia e cultivo - Evolução, situação atual e perspectiva do Nordeste Brasileiro**. Fortaleza: Editora Universidade Federal do Ceará, 2009. p.326.

BOYD, C. E. **Farm-Level Issues in Aquaculture Certification: Tilapia Report** commissioned by world wild life - US, 2005. 18p.

BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2008 - 2009**. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2011. 100 p.

DENEV, S. A.; STAYKOV, Y.; MOUTAFCHIEVA, R.; BEEV, G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. **International Aquatic Research**, v.1, n. 4, p. 1-29, 2009.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D. L.; CARNEVALI, O.; PICCHIETTI, S.; AVELLA M.; DANIELS, C.; GÜROY, D. DAVIES, S. J. Microbial manipulation to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 1-16, 2011.

EL-HAROUN, E. R.; GODA, A. M.; KABIR CHOWDHURY, M. A. Effect of dietary probiotic Biogen ® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473-1480, 2006.

EL-SAYED, A. M. **Tilapia culture**. London: Cabi. 2006. 277p.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2010**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010. 105p.

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

GHAZALAH, A. A.; ALI, H. M.; GEHAD, E. A.; HAMMOUDA, Y. A.; ABO-STATE, H. A. Effect of probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed low protein diets. **Nature and Science**, v. 8, n. 5, p. 46-53, 2010.

GIL-TURNES, C.; DOS SANTOS, A. F.; DA CRUZ, F. W.; MONTEIRO, A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n.1, p 11-14, 1999.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A. Selection of probiotic bacteria for use in aquaculture. In: FLEGEL, T. W. **Advances in shrimp biotechnology**. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 1998. 296p.

HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RINGØ, E.; YOON, I. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂) cultured in cages. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 99-107, 2009.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5241-5247, 2000.

HONG, H. A.; DUC, L. H., CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 813-835, 2005.

KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiologie Aliments Nutrition**, n. 4, p. 121-135, 1986.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; GUZMAN-MENDEZ, B. E.; LOPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 193-201, 2003.

LÖHNERT, H. J.; OCHRIMENKO, W. I.; BARGHOLZ, J. Influence of the feed additive “Toyocerin” on the rearing result of calves. In: SYMPOSIUM VITAMINS AND ADDITIVES IN NUTRITION OF MAN AND ANIMAL, 7., 1999, Jena. **Abstracts...** Jena, Thuringia: Institut für Ernährungswissenschaften- Universität Jena, 1999. p.52.

MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M.; MOTA, F. L. S.; PASSOS NETO, O. P.; SILVA NETO, A. A.; SILVA, A. I. M.; OGAWA, M. Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob à inclusão de probiótico em água mesohalina. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 403-414, 2010.

MESALHY, A. S. M.; YOUSEF, A. G. A.; GHAREEB, A. A. A; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 28-136, 2008.

MÜLLER, F. Economical analysis of some superintensive technologies for fish production in Szarvas. **Aquacultura Hungarica**, v. 6, p. 235-246, 1990.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, p. 2-14, 2010.

PIRARAT, N.; KOBAYASHI, T.; KATAGIRI, T.; MAITA, M.; ENDO, M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology Immunopatology**, v. 113, n. 3-4, p. 339-347, 2006.

RICHTER, G.; KÜHNE, I.; KÖHLER, H. Test of Toyocerin in broiler fattening. In: SYMPOSIUM VITAMINS AND ADDITIVES IN NUTRITION OF MAN AND ANIMAL, 7., 1999, Jena. **Abstracts**. Jena, Thuringia : Institut für Ernährungswissenschaften - Universität Jena, 1999. p.52-53.

SAHU, M.; SWARNAKUMAR, N.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 299-308, 2008.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO J. Y.; KIM, S.; PARK, S.; YOSHIKAWA, T.; SAKATA, T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 4, p. 755-767, 2006.

WANG, Y. B.; TIAN, Z. O.; YAO, J. T.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 203-207, 2008.

ZANI, J. L.; DA CRUZ, F. W.; DOS SANTOS, A. F.; GIL-TURNES, C. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 68-71, 1998.

ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y.; LI, W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 501-509, 2009.

4 *Bacillus cereus* VAR.TOYOI E *Bacillus subtilis* C-3102 PARA JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO CULTIVADOS EM TANQUES REDE

4.1 Resumo

O presente trabalho objetivou estudar o efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados à dieta para juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT e com isso avaliar a colonização do intestino, a influência sobre a microflora bacteriana, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e centesimal e os parâmetros da qualidade da água, no cultivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*). Distribuiu-se aleatoriamente 1800 alevinos machos, sexualmente revertidos, em quatro tratamentos com cinco repetições. Utilizaram-se rações comerciais adicionadas de 0,5% de *Bacillus cereus* var. Toyoi, 0,5% de *Bacillus subtilis* C-3102, 0,5% da combinação dos dois probióticos (*B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102) e sem adição de probióticos. Utilizou-se tanques rede com volumes de 0,175 m³, contendo 90 alevinos com peso médio de 0,34 g, instalados em viveiros escavados com 8,4 m³ de água. Os índices de sobrevivência variaram de 80% a 90% e a conversão alimentar de 1,69 a 1,96 para os tratamentos contendo *B. subtilis* C-3102 e sem adição de probióticos, respectivamente. Os níveis de proteína bruta das carcaças variaram de 13,08% para os juvenis que receberam a combinação dos dois probióticos a 13,78% para as dietas com *B. cereus* var. Toyoi. O índice vicerosomático variou de 9,71% para a combinação dos dois probióticos a 10,9%, para *B. subtilis* C-3102, respectivamente. Ao longo do experimento verificou-se que os probióticos utilizados realizaram a colonização do epitélio intestinal das tilápias e a água do cultivo, porém, não influenciaram ($p > 0,05$) o número de mesófilos totais e coliformes totais. O desempenho zootécnico, a composição corporal, a centesimal dos juvenis de tilápia do Nilo e a qualidade da água não foram influenciados ($p > 0,05$) pela adição dos probióticos à ração.

Palavras-chave: desempenho zootécnico, microflora intestinal, probióticos, qualidade da água, tilapicultura.

4.2 Abstract

***Bacillus cereus* VAR. TOYOI AND *Bacillus subtilis* C-3102 FOR JUVENILE NILE TILAPIA REARED IN CAGES**

The present study investigated the effect of probiotics *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Bacillus subtilis* C-3102 added to the diet for juvenile Nile tilapia GIFT strain and thus evaluate the colonization of the gut, the influence on the bacterial microflora, the productive performance, the indexes of body composition, the chemical composition and water quality in the cultivation of juvenile Nile tilapia GIFT strain (Genetically Improved Farmed tilapia). A total of 1800 fingerlings males, sexually reversed, were randomly distributed in four treatments with five replicates. The commercial feed added 0.5% of *Bacillus cereus* var. Toyo, 0.5% of *Bacillus subtilis* C-3102, 0.5% of the combination of two probiotics (*B. cereus* var. Toyoi and *B. subtilis* C-3102) and without addition of probiotic. There were used cages with volumes of 0.175 m³, containing 90 fingerlings with average weight of 0.34 g, installed in ponds with 8.4 m³ of water. Survival rates ranged from 80% to 90% and feed conversion from 1.69 to 1.96 for treatments containing *B. subtilis* C-3102 and without addition of probiotic, respectively. The crude protein levels of carcasses ranged from 13.08% for the juveniles fed the combination of the two probiotics to 13.78% for the diets with *B. cereus* var. Toyo. The viscerosomatic index ranged from 9.71% for the combination of the two probiotics to 10.9% for *B. subtilis* C-3102, respectively. Throughout the experiment it was found that probiotics used made the colonization of the gut epithelium of tilapia and water cultivation, however, did not influence ($p > 0.05$) the number of mesophiles and total coliforms. The productive performance, body composition, chemical composition of juvenile Nile tilapia and water quality were not affected ($p > 0.05$) by the addition of probiotics to the diet.

Keywords: gut microflora, probiotics, production performance, tilapia culture, water quality

4.3 Introdução

A produção brasileira de pescado tem aumentado significativamente com sucessivos índices de crescimento e no ano de 2009 chegou a 1.240.813 toneladas. Neste quantitativo, a aquicultura que atualmente responde por aproximadamente 33% desta produção, vem merecendo lugar de destaque (BRASIL, 2011).

O crescimento da aquicultura é muito importante para a economia, porém, o aumento desta atividade nos corpos de água doce pode trazer como consequência, o risco de epidemias causadas por bactérias patogênicas, visto que, modifica-se o ambiente natural para a produção de organismos aquáticos. A manutenção de altas densidades de populações de peixes em áreas limitadas também pode favorecer o surgimento e a propagação de doenças que são responsáveis por perdas econômicas significativas (BOYD; MASSAUNT, 1999).

Para melhorar a produtividade na aquicultura, antibióticos e quimioterápicos têm sido utilizados em cultivos intensivos como promotores de desempenho e no controle da proliferação de agentes bacterianos patogênicos. Entretanto, esta prática tem preocupado a comunidade científica em razão da possibilidade destes produtos deixarem resíduos na carne ou no ambiente aquático, promovendo o aparecimento de microrganismos resistentes e peixes mais suscetíveis a outras infecções e infestações parasitárias, podendo também prejudicar a saúde humana (DENEV et al., 2009).

Estas questões têm levado pesquisadores a estudar a utilização de outros produtos alternativos aos antibióticos, como por exemplo, probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos e fitoterápicos (HOA et al., 2000).

Segundo Sahu et al. (2008) e Cutting (2011), os probióticos vêm sendo destaque na indústria mundial. São organismos vivos que, quando administrados e consumidos em quantidades adequadas sobrevivem ao trato gastrointestinal, aderindo à parede epitelial e proliferando-se no intestino do hospedeiro (FAO, 2006).

Os probióticos podem atuar na redução e prevenção de patógenos com a melhoria da flora bacteriana intestinal, diminuir a carga bacteriana por exclusão competitiva, produzir substâncias inibidoras, auxiliar na digestão de alimentos com a produção de enzimas digestivas suplementares e estimular o sistema imunológico dos animais. Quando adicionados à dieta devem também, sobreviver aos longos períodos de estocagem e armazenagem das rações (VERSCHUERE et al., 2000).

A utilização de microrganismos do gênero *Bacillus* na aquicultura é uma prática de manejo nutricional que está se expandindo rapidamente em regiões com criação intensiva de

peixes, principalmente na Ásia (HONG et al., 2005; QI et al., 2009; CUTTING, 2011). Contudo, ainda são necessárias pesquisas científicas para verificar a espécie ou a combinação mais adequada, a sua eficácia e modo de ação probiótica no trato gastrointestinal das tilápias (ZHOU et al., 2010).

Os *Bacillus* têm sido utilizados como probióticos para alguns peixes como *Scophthalmus maximus* (GATESOUBE, 1994), *Ictalurus punctatus* (QUEIROZ; BOYD, 1998), *Oncorhynchus mykiss* (NIKOSKELAINEN et al., 2003), *Dentex dentex* (HIDALGO et al., 2006), *Oreochromis niloticus* (EL-HAROUN et al., 2006; ALY et al., 2008a; ALY et al., 2008b; GHAZALAH et al., 2010, ZHOU et al., 2010) e *Oreochromis* sp. (MARENGONI et al., 2010), porém os estudos com tilápia do Nilo da linhagem GIFT ainda são incipientes.

Os *Bacillus cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 são produtos autorizados pela *European Food Safety Authority* (EFSA). São compostos por esporos liofilizados que adicionados à ração animal objetivam colonizar o intestino e influenciar favoravelmente a produção e o desempenho do animal, contribuindo para o crescimento, a eficiência alimentar e modulando a flora gastrointestinal. Suas estirpes são suscetíveis a antibióticos e não possuem potencial toxigênico. Estes probióticos são utilizados comercialmente para bovinos, aves, coelhos e suínos (SILLEY, 2006) e experimentalmente têm sido objetivo de estudo no cultivo de camarões e peixes (RENGPIPAT et al. 2003; HIDALGO et al., 2006; EL-DAKAR et al. 2007; SOUZA et al., 2011).

Objetivou-se avaliar a colonização do intestino pelos probióticos, a influência sobre a microflora bacteriana, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e centesimal e os parâmetros da qualidade da água, no cultivo em tanques rede de juvenis tilápia do Nilo da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), submetidas às rações comerciais adicionadas de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102.

4.4 Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (CPAA) em Toledo, Paraná, Brasil, durante os meses de novembro de 2009 a abril de 2010, totalizando 127 dias.

A fonte de abastecimento foi oriunda do Rio São Francisco Verdadeiro e a renovação da água ocorria apenas para a manutenção de perdas por evaporação ou infiltração, mantendo a repleção dos viveiros.

Utilizou-se 1.800 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), sexualmente revertidos, com peso inicial médio de $0,34 \pm 0,06$ g, e tamanho inicial médio de $2,89 \pm 0,26$ cm, adquiridos de uma piscicultura comercial.

Realizou-se a biometria inicial em uma amostragem do lote com 100 peixes para verificação de peso e comprimento médio. Os alevinos foram distribuídos aleatoriamente em um delineamento inteiramente casualizado em 20 tanques rede de dimensões 0,5m x 0,5m x 0,7m, respectivamente, para comprimento, largura e altura, resultando em um volume de $0,175 \text{ m}^3$. Os tanques redes com malha 4,0 mm foram instalados individualmente em viveiros escavados de $8,4 \text{ m}^3$ e dimensões de 3 m x 4 m, com paredes revestidas em alvenaria e fundo de solo natural. Foi considerado como uma unidade experimental cada tanque rede contendo 90 peixes, respeitando-se o período de adaptação dos animais às condições experimentais de sete dias.

O experimento foi composto por uma dieta com quatro tratamentos sendo três com adição de probióticos e um sem adição de probiótico, com cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais. A dieta constituiu-se de ração comercial, indicada para cada fase de cultivo (Tabela 4.1), adicionada de 0,5% de probióticos na forma liofilizada que foram dissolvidos em 2% de óleo vegetal. Os probióticos utilizados para este fim foram *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102, padronizados para proporcionalmente representarem 500 milhões de esporos por grama quando adicionados à ração, sendo testados de forma individual e combinada. O tratamento sem a adição de probiótico foi constituído apenas da ração acrescida do óleo vegetal, na mesma proporção utilizada nos demais tratamentos.

Na fase inicial, foi utilizada a ração na forma farelada contendo 50% de proteína bruta até os animais atingirem peso médio de aproximadamente 10g, fornecida manualmente cinco vezes ao dia nos horários das 7, 10, 13, 16 e 19 horas; na fase de cultivo onde os peixes possuíam de 10g a 30g foi utilizada a ração extrusada de 2 mm com 38% de proteína bruta, fornecida quatro vezes ao dia nos horários das 7, 11, 15 e 19 horas; após os peixes atingirem 30g até o final do experimento utilizou-se a ração extrusada de 4 mm com 36% de proteína bruta fornecida três vezes ao dia às 10, 13 e 16 horas.

Diariamente, a dieta foi oferecida na proporção de 10% da biomassa nos primeiros 74 dias de experimento, 6% entre o 75º e o 102º dias e 4% entre o 103º e o 126º dias.

Tabela 4.1 Composição das rações comerciais para alevinos de tilápia do Nilo de acordo com as fases de cultivo, adaptada de Algomix® Agroindustrial Ltda.

Composição	Ração		
	Farelada (%) ^(I)	Extrusada 2 mm (%) ^(II)	Extrusada 4 mm ^(III) (%)
Cálcio máximo	5	5	5
Cálcio mínimo	2	2	2
Extrato etéreo	9	6	6
Fósforo	2	2	2
Iodo	0	0	0
Matéria fibrosa	5	3	3
Matéria mineral	10	9	8
Proteína bruta	50	38	36
Umidade	13	13	13

Níveis de garantia por kg dos produtos (I), (II) e (III): vit. A 12.000 UI, 11.000 UI e 11.000 UI; vit. B1 6 mg, 8 mg e 9 mg; vit. B12 25 µg, 25 µg e 25 µg; vit. B2 10 mg, 4 mg e 0 mg; vit. B6 5 mg, 6 mg e 20 mg; vit. C 500 mg, 400 mg e 400 mg; vit. D3 1.500 UI, 2.100 UI e 3.000 UI; vit. E 25.000 UI, 25.000 UI e 25.000 UI; vit. K3 1.500 mg, 1.500 mg; 1.500 mg; ácido fólico 1 mg, 1,5 mg e 1,5 mg; ácido pantotênico 33 mg, 31 mg e 30 mg; biotina 0,25 mg, 0,7 mg e 0,75 mg; cobalto 0,5 mg, 0,5 mg e 0,5 mg; cobre 25 mg, 2,5 mg e 2,5 mg; colina 1.700 mg, 500 mg e 0 mg; ferro 50 mg, 40 mg e 90 mg; manganês 25 mg, 25 mg e 25 mg; niacina 50 mg, 35 mg e 30 mg; zinco 250 mg, 250 mg e 250 mg.

A quantidade de ração ofertada seguiu a recomendação do fabricante (Tabela 4.2) com o objetivo de avaliar o efeito da fonte de variação.

Tabela 4.2 Taxa de arraçoamento para tilápia do Nilo em função da temperatura da água e peso vivo (PV).

Peso dos peixes	Arraçoamento	Temperatura da água (°C)				
		<20	20 a 24	24 a 28	28 a 32	>32
Pós-larvas a 1 g	(% PV/dia)	-	4 a 6	6 a 10	10 a 20	6 a 10
	Refeição/dia	-	3	4 a 5	5 a 6	4 a 5
1 a 5 g	(% PV/dia)	2 a 3	3 a 5	5 a 7	7 a 10	5 a 7
	Refeição/dia	1 a 2	2 a 3	3 a 4	4 a 5	3 a 4
5 a 30 g	(% PV/dia)	1 a 2	2 a 3	3 a 5	5 a 6	3 a 5
	Refeição/dia	1	2	2 a 3	3 a 4	2 a 3
30 a 100 g	(% PV/dia)	1	1 a 2	2 a 3	3 a 5	2 a 3
	Refeição/dia	1	1 a 2	2	2 a 3	2

Fonte: Algomix® Agroindustrial Ltda

As biometrias foram realizadas mensalmente com a coleta de todos os indivíduos de cada tanque rede para determinar a biomassa total, o peso médio e a quantidade total de peixes, com isso realizaram-se os ajustes na quantidade de ração a ser fornecida.

As análises microbiológicas das amostras de intestino e da água do cultivo, ocorridas a cada biometria, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Pontifícia Universidade

Católica do Paraná, *campus* de Toledo (PUCPR/Toledo), de acordo com os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, propostos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Durante as biometrias, coletou-se aleatoriamente três peixes de cada tanque rede para a extração do intestino e 10 mL de água, a fim de, quantificar o número de bactérias mesofílicas totais, coliformes totais e a colonização pelos probióticos por grama de intestino e por mililitro de água.

Os peixes coletados foram mantidos vivos em recipiente com água para o transporte ao laboratório de microbiologia. No laboratório os animais foram abatidos através da secção da medula, em seguida foi realizada a higienização do abdômen de cada peixe através de solução com álcool 70%, para o corte abdominal.

Os intestinos foram retirados assepticamente com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica sob a presença da chama, para obtenção de 1 g de cada peixe. As amostras coletadas foram maceradas com auxílio de pistilo e cápsula de porcelana, previamente esterilizados. Houve então a adição de 1 mL de água destilada estéril para homogeneização e passagem do material para os tubos de ensaio estéril contendo 9 mL de água destilada estéril. Os tubos com as amostras foram homogeneizados novamente com o auxílio do equipamento vórtex.

Dos materiais homogeneizados, realizaram-se diluições decimais em tubos com água destilada estéril (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) para o posterior plaqueamento com semeadura em profundidade em cada meio de cultura específico.

Os meios de cultura utilizados nas análises quantitativas foram o Ágar Padrão de Contagem, para contagem de mesófilos totais e o Ágar MacConkey, para contagem de coliformes totais; e para a análise qualitativa (presença/ausência) dos probióticos o meio Ágar Diferenciação de *Bacillus*.

As amostras contidas nas placas de petri foram incubadas em estufa microbiológica com temperatura regulada a 27 °C por 24 horas. Após a incubação foram realizadas as contagens de bactérias típicas para mesófilos totais e coliformes totais com o auxílio do equipamento contador automático de colônias modelo Phoenix CP 600. Já, para as análises qualitativas pertinentes aos probióticos, ocorreram pela análise dos aspectos morfológicos das colônias e também pelo método de coloração de Gram com auxílio de microscópio óptico.

O monitoramento da qualidade da água do cultivo iniciou em seguida ao enchimento dos viveiros, com a temperatura da água medida diariamente e semanalmente o oxigênio dissolvido, utilizando-se o oxímetro digital modelo Hanna HI 9828, o potencial

hidrogeniônico pelo peagâmetro portátil Hanna HI 8424, a condutividade com o condutivímetro Hanna HI 9835 e a transparência da água com o disco de Secchi.

Registrou-se também a média pluviométrica semanal referente ao período experimental, medida em milímetros por metro quadrado, por meio dos dados coletados pela Estação Agrometeorológica modelo Agrosystem Advantage Pro2, instalada na PUCPR/Toledo.

Os índices de desempenho zootécnico foram acompanhados mensalmente por meio dos dados de cada biometria e ao término do experimento. Na última biometria, foram determinados os parâmetros de peso médio final, biomassa final, consumo de ração, conversão alimentar, sobrevivência, ganho em peso diário e taxa de crescimento específico (TCE) definida pela equação $TCE (\%) = [100 \times (\ln \text{Peso médio final} / \ln \text{Peso médio inicial})] / \text{número de dias}$, utilizado por Legendre e Kerdchuen (1995), onde *ln* representa o logaritmo neperiano e o fator de condição (Kn) de Fulton (1904) por meio da equação $Kn = W / (L^3 / 100)$, sendo W o peso (g) e L o comprimento total (cm).

Ao final do experimento trinta e cinco peixes de cada tratamento, mantidos em jejum, foram anestesiados, abatidos e dissecados, para determinação dos índices de composição corporal, viscerossomático, hepatossomático e gordura visceral e para a análise da composição centesimal das carcaças para proteína bruta, matéria seca, extrato etéreo e matéria mineral, conforme AOAC (1995).

Os valores médios coletados ao longo do experimento por meio das biometrias foram submetidos à análise de variância por medidas repetidas (MANOVA) e os valores médios coletados somente na última biometria, ou seja, ao término do experimento, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando detectadas diferença significativa entre os tratamentos, aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistica 7.1[®]. Além disso, estimou-se o coeficiente de correlação de Pearson entre os resultados das contagens de mesófilos totais das amostras de intestino e da água.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (protocolo nº 81/2009 CEEAAP/Unioeste).

4.5 Resultados e discussão

Verificou-se que os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados à dieta para alevinos de tilápia do Nilo colonizaram o intestino dos peixes (Tabela 4.3) e não foram observadas doenças ou mortalidades. Tal característica enquadra estas bactérias como probióticos ideais segundo a descrição de Nayak (2010), onde afirma que para ser atribuído como probiótico, independente da sua fonte, o microrganismo deve ser capaz de se estabelecer, colonizar e multiplicar no intestino do hospedeiro sem causar efeitos maléficos.

Tabela 4.3 Valores médios e desvios padrões de contagens de mesófilos totais e coliformes totais das amostras de intestino e água, oriundos do cultivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações adicionadas de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Amostra/microrganismo	Probiótico				P
	BC	BS	BC+BS	SP	
Intestino					
Mesófilos totais (UFC x 10 ⁵ g ⁻¹)	2,08 ± 0,85	2,38 ± 1,31	2,56 ± 0,50	2,50 ± 0,53	0,816
Coliformes totais (UFC x 10 ³ g ⁻¹)	2,80 ± 0,82	2,61 ± 0,51	3,09 ± 1,39	3,85 ± 0,91	0,227
<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi g ⁻¹	+	-	+	-	
<i>Bacillus subtilis</i> C-3102 g ⁻¹	-	+	+	-	
Água					
Mesófilos totais (UFC x 10 ⁴ mL ⁻¹)	5,03 ± 1,32	5,26 ± 1,41	5,60 ± 1,43	5,75 ± 1,59	0,852
Coliformes totais (UFC x 10 ² mL ⁻¹)	2,43 ± 0,21	2,53 ± 0,27	2,43 ± 0,22	2,52 ± 0,06	0,797
<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi mL ⁻¹	+	-	+	-	
<i>Bacillus subtilis</i> C-3102 mL ⁻¹	+	+	+	-	

+ = presença; - = ausência.

O número de bactérias mesofílicas totais, assim como o número de coliformes totais não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$), tanto para as amostras de intestino como para as amostras da água do cultivo (Tabela 4.3). Dentro de cada biometria não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos para estes parâmetros (Figura 4.1).

Observou-se que o quantitativo de UFC para bactérias mesofílicas totais por grama de intestino (UFC/g⁻¹) estabilizou durante as biometrias, não apresentando variação ($p > 0,05$), apesar do fornecimento diário dos probióticos adicionados à ração (Figura 4.1).

Günther e Jimenez-Montealegre (2004), utilizando *Bacillus subtilis* como probiótico para tilápia do Nilo, também verificaram que a influência sobre a comunidade bacteriana mesofílica foi relativamente pequena, porém, no ambiente intestinal, assim como na água este comportamento poderia ser compensado por outros efeitos positivos como a produção pelo probiótico de bacteriocinas sobre bactérias patogênicas.

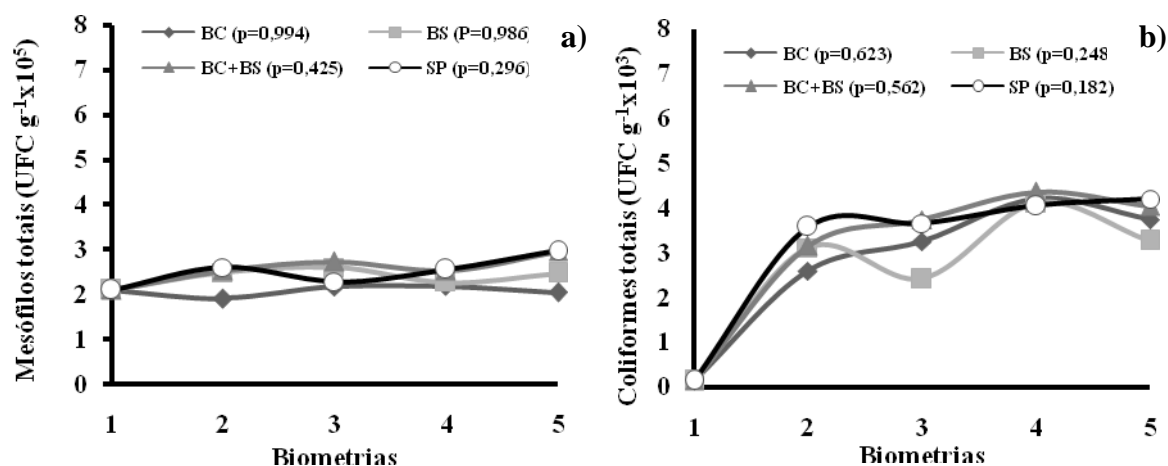


Figura 4.1 Médias da microflora intestinal para mesófilos totais (a) e coliformes totais (b), durante o cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Os probióticos colonizaram o ambiente aquático (Tabela 4.3), mas não influenciaram as populações de microrganismos mesófilos totais e coliformes totais que apresentaram resultados variáveis (Figura 4.2) de acordo com as condições da água e das precipitações pluviais (Figura 4.3b).

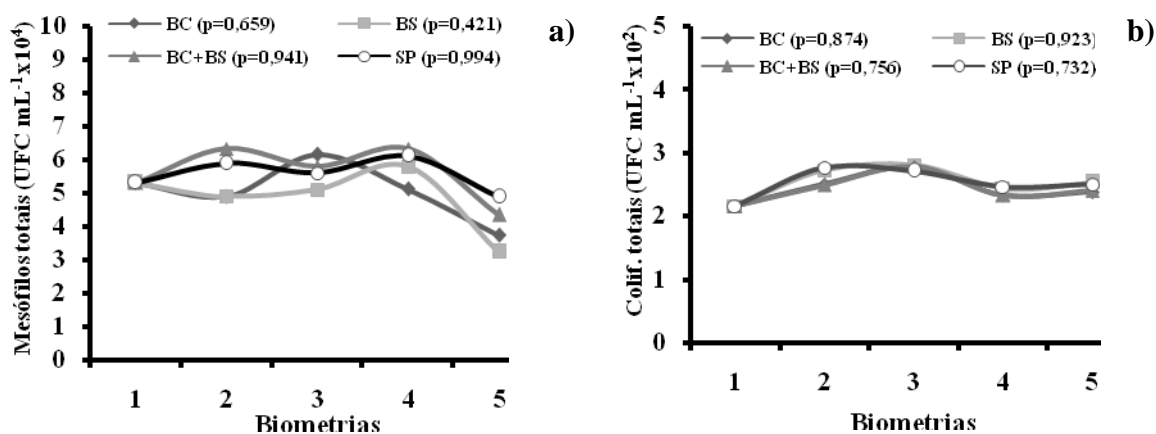


Figura 4.2 Valores médios de mesófilos totais (a) e coliformes totais (b) na água, durante os meses de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

De acordo com Avault (2003), em sistemas de produção de peixes ocorrem modificações nas condições ambientais da água influenciadas por fatores alóctones e autóctones, que incluem as variáveis físicas, químicas e biológicas, as quais determinam as condições de cultivo. Em viveiros localizados em áreas abertas, as variáveis ambientais são mais impactantes, como por exemplo, a radiação solar e a pluviosidade. Nos períodos que

ocorrem maior precipitação pluvial há uma diluição na quantidade de nutrientes presentes no meio, e conseqüentemente no número de microrganismos. Já em épocas com baixa pluviosidade e maior radiação solar ocorre o aumento da temperatura da água e alterações nas taxas biológicas de ciclagem de nutrientes, favorecendo a multiplicação de microrganismos presentes no meio. A relação entre as precipitações pluviais e a transparência da água dos viveiros ao longo do tempo foi verificada neste experimento e encontra-se apresentada na Figura 4.3b.

Ao longo do período experimental as contagens de UFC para mesófilos totais das amostras de intestino e da água não apresentaram correlação ($r = 0,003$).

Na Figura 4.3 verifica-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores médios dos parâmetros de qualidade da água, quinzenalmente avaliados, em relação à adição de probióticos nas dietas dos juvenis de tilápia do Nilo. Zhou et al.(2010), avaliando o efeito da adição de *Bacillus subtilis* B10, *Bacillus coagulans* B16, *Rhodopseudomonas palustris* G06 na água de cultivo de tilápia do Nilo, também não observaram diferenças significativas nos parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos.

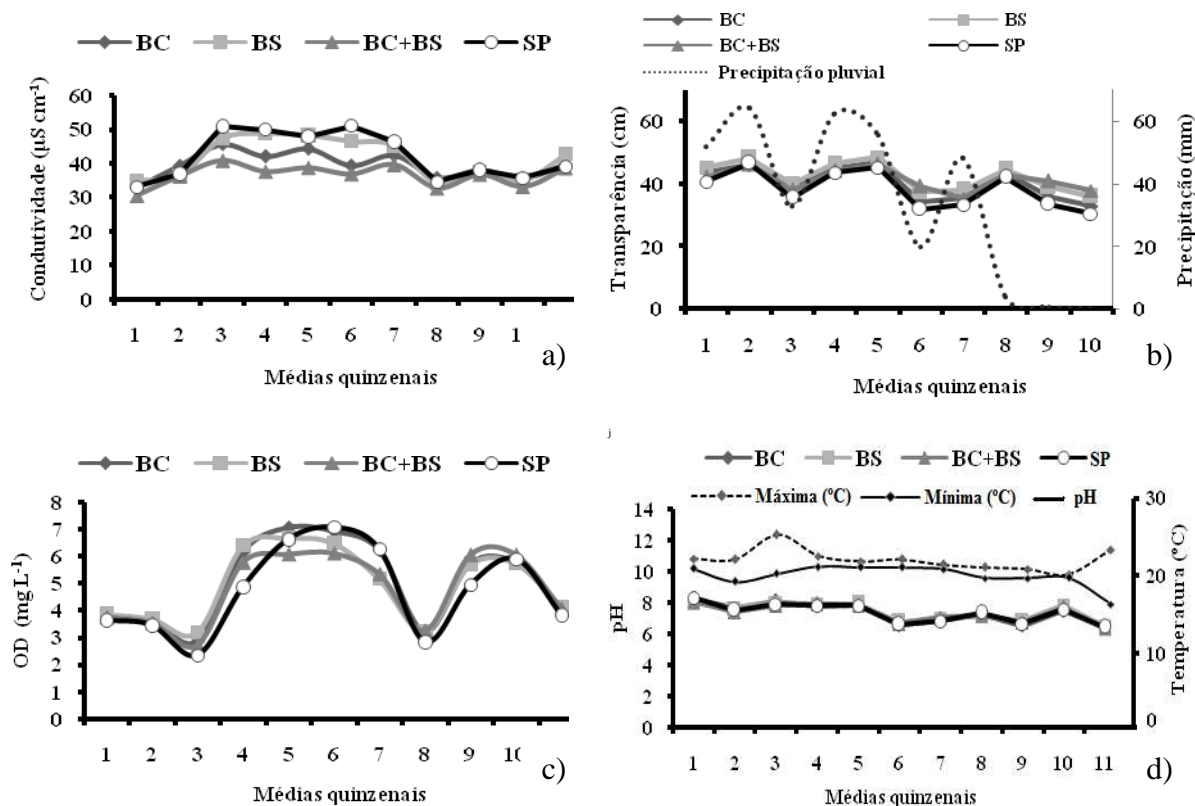


Figura 4.3 Valores médios dos parâmetros de qualidade da água para condutividade (a), transparência e precipitação (b), oxigênio dissolvido (c), pH e temperatura (d), observados durante o período experimental.

Carvalho et al. (2009) testaram a eficácia da adição na água de uma combinação de microrganismos probióticos (*Bacillus subtilis*, *B. coagulans* e *Saccharomyces cerevisiae*) utilizados diretamente na água para o transporte de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e verificaram que houve menor concentração de amônia nos tanques onde os peixes foram transportados com probióticos, o que conseqüentemente diminuíram os parâmetros indicadores de estresse sanguíneos nos peixes, durante a fase de recuperação, ao contrário dos demais peixes transportados sem probióticos.

A condutividade média (Figura 4.3a) variou de $28,40 \pm 10,3$ a $51,04 \pm 15,4 \mu\text{S cm}^{-1}$ e a transparência (Figura 4.3b) apresentou variação média de $31 \pm 8,47$ a $50 \pm 11,20$ cm, sendo influenciada pelos índices de precipitação pluvial, visto que durante períodos em que ocorrem as precipitações, o fitoplâncton diminuiu significativamente o que ocasionou maior transparência da água nos viveiros. Inversamente, em períodos de estiagem e maior incidência solar ocasionou proliferação do fitoplâncton e conseqüentemente à diminuição da transparência da água determinada pelo disco de Sechi. Segundo Macedo e Sipaúba-Tavares (2005), na aquicultura é normal ocorrer o crescimento de algas que são favorecidas pela elevada temperatura, assim, como, pela alta taxa de ciclagem de nutrientes provenientes de dejetos dos peixes e sobras de ração.

O oxigênio dissolvido (Figura 4.3c) variou de 2,30 a 7,8 mg L⁻¹ e o pH (Figura 4.3d) de 6,7 a 7,8. Estes dois parâmetros são diretamente relacionados segundo Sipaúba-Tavares (1992), pois o fitoplâncton produz oxigênio no período do dia, consumindo o gás carbônico que é acidificante, provocando aumento do pH em função da respiração e decomposição do meio. O pH por sua vez frequentemente interfere na distribuição dos organismos aquáticos e no decorrer do dia os processos biológicos na água interferem na flutuação do pH.

Os parâmetros verificados são considerados adequados ao cultivo da espécie, sendo que apenas os valores médios da temperatura máxima diária (Figura 3d), que variou entre 23,40° e 26,60°C ficou relativamente abaixo da temperatura ideal indicada para o cultivo de tilápia do Nilo que é entre 25° a 30°C, conforme Boyd (2005).

A adição dos probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 não influenciou ($p > 0,05$) o desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia do Nilo (Tabela 4.4). A conversão alimentar e a sobrevivência variaram de $1,69 \pm 0,29$ a $1,96 \pm 0,94$ e 80 ± 18 a $90 \pm 2\%$, respectivamente para os tratamentos com *B. subtilis* e sem adição de probiótico, estando de acordo com os índices esperados para o cultivo da espécie segundo Boyd (2005). Zhou et al. (2010), avaliando o efeito da adição de *Bacillus subtilis* B10, *Bacillus coagulans* B16, *Rhodopseudomonas palustris* G06 na água de cultivo de tilápia do Nilo, também não

observaram diferenças significativas para desempenho entre o tratamento com *B. subtilis* e o controle.

Tabela 4.4 Valores médios e desvios padrões dos parâmetros de desempenho zootécnico no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Parâmetro	Probiótico				p
	BC	BS	BC+BS	SP	
Peso médio (g)	88,95 ± 16,59	100,52 ± 8,14	87,63 ± 11,39	89,52 ± 16,87	0,44
Biomassa final (kg)	6,28 ± 1,03	7,69 ± 0,71	6,54 ± 1,17	6,5 ± 1,85	0,19
Consumo de ração (kg)	11,94 ± 0,92	12,83 ± 1,71	10,56 ± 0,00	10,43 ± 1,97	0,23
Conversão alimentar	1,95 ± 0,31	1,69 ± 0,29	1,71 ± 0,71	1,96 ± 0,94	0,84
Sobrevivência (%)	85 ± 9	90 ± 2	88 ± 7	80 ± 18	0,43
Ganho em peso diário (g)	0,70 ± 0,13	0,79 ± 0,06	0,69 ± 0,09	0,70 ± 0,13	0,44
Crescimento específico (% dia ⁻¹)	4,14 ± 0,15	4,24 ± 0,06	4,14 ± 0,10	4,15 ± 0,15	0,47
Fator de condição (Kn)	1,45±0,16	1,6± 0,07	1,52± 0,23	1,37± 0,21	0,10

Marengoni et al. (2010), utilizando como probióticos comerciais uma mistura de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* em rações para alevinos de tilápia vermelha, encontraram resultados semelhantes, onde os probióticos também não influenciaram o desempenho zootécnico e a sobrevivência. Segundo Cross (2002), os probióticos têm sua ação evidenciada em períodos de baixa resistência, tais como estresse e contaminação por bactérias prejudiciais aos organismos, o que não foi observado durante o período experimental.

Diferentemente dos resultados de performance dos peixes do presente trabalho, Aly et al. (2008b) mostraram que uma dose baixa de *Bacillus pumilus* induziu um aumento significativo no ganho em peso quando utilizado durante dois meses no cultivo de tilapia. Efeitos positivos ($p < 0,01$) no ganho em peso e taxa de crescimento específico dos juvenis de tilapia do Nilo que receberam a adição de probiótico (Biogen[®]) na dieta foram observados por El-Haroun et al. (2006). A administração de probióticos, *B. coagulans* B16 e *R. palustris* G06 via água do tanque, teve também efeitos benéficos sobre o desempenho de tilápia do Nilo (ZHOU et al., 2010).

Os efeitos positivos dos promotores de crescimento no desempenho produtivo em peixes nem sempre são evidenciados, isso pode estar relacionado com as características de cada produto utilizado como probiótico em diversas espécies, o tipo de ingrediente das dietas ou nível de estresse aos quais os animais estão submetidos (Marengoni et al. 2010).

O fator de condição (Kn) é um indicador quantitativo do grau de hígidez ou do bem-estar dos peixes (FROESE, 2006). Desta forma, observou-se que o Kn não foi influenciado (p

> 0,05) pela utilização dos probióticos e variou de $1,37 \pm 0,21$ a $1,60 \pm 0,07$, respectivamente para os tratamentos adicionados de *B. subtilis* C-3102 e sem adição de probióticos (Tabela 4.4), estando abaixo dos verificados por Marengoni e Santos (2006), que encontraram variações entre 1,87 a 1,95, em pesquisa de avaliação do rendimento e composição de filés de tilápia do Nilo cultivados em pesque pagues.

A adição dos probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 não influenciou ($p > 0,05$) os índices de composição corporal víscerosomáticos, hepatosomáticos e de gordura visceral dos peixes (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 Valores médios e desvios padrões dos índices de composição corporal e índices de composição centesimal de juvenis de tilápia do Nilo GIFT, submetidas às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Índice	Probiótico				p
	BC	BS	BC+BS	SP	
Composição corporal (%)					
Viscerosomático	$10,4 \pm 1,35$	$10,9 \pm 3,03$	$9,71 \pm 0,62$	$10,31 \pm 1,00$	0,765
Hepatosomático	$2,5 \pm 0,39$	$3,0 \pm 0,45$	$2,27 \pm 0,33$	$2,24 \pm 0,47$	0,264
Gordura visceral	$2,0 \pm 0,29$	$2,0 \pm 0,44$	$1,72 \pm 0,39$	$1,67 \pm 0,46$	0,560
Composição centesimal					
Matéria seca	$23,80 \pm 0,83$	$23,60 \pm 1,14$	$23,6 \pm 1,51$	$23,08 \pm 1,42$	0,827
Proteína bruta	$13,78 \pm 0,90$	$13,65 \pm 1,38$	$13,08 \pm 0,58$	$13,48 \pm 1,38$	0,776
Extrato etéreo	$4,78 \pm 0,84$	$04,33 \pm 1,00$	$04,13 \pm 0,95$	$4,49 \pm 0,67$	0,690
Matéria mineral	$3,08 \pm 0,80$	$2,20 \pm 0,64$	$2,96 \pm 1,28$	$3,10 \pm 1,11$	0,441

A deposição de gordura visceral variou de $1,67 \pm 0,46$ a $2 \pm 0,29\%$, respectivamente para os tratamentos adicionados de *B. cereus* var. Toyoi e sem adição de probióticos, estando dentro do nível esperado para o bom desempenho da tilápia do Nilo, apesar da utilização do óleo vegetal na proporção de $2\% \text{kg}^{-1}$ de ração para a adição dos probióticos (Tabela 4.5).

A utilização dos probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 adicionados à dieta não influenciou ($p > 0,05$) a composição centesimal para proteína bruta, matéria seca, extrato etéreo e matéria mineral das carcaças de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT (Tabela 4.5). El-Haroun et al. (2006) também não encontraram diferenças para cinzas, umidade e teor de proteína, utilizando diferentes taxas de inclusão de um probiótico comercial contendo *Bacillus subtilis* (Biogen®) nas dietas de juvenis de tilapia do Nilo.

4.6 Conclusão

Os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados individualmente ou combinados a ração comercial na proporção de 0,5% para juvenis de tilápia do Nilo, colonizaram o intestino dos peixes e a água dos viveiros, contudo, não influenciaram a microflora bacteriana intestinal, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e centesimal e os parâmetros da qualidade da água.

4.7 Referências

ALY, S. M.; AHMED, Y.; GHAREEB, A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immunology**, v. 25, p. 128-136, 2008a.

ALY, S. M.; MOHAMED, M. F.; JOHN, G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 39, n. 6, p. 647-656, 2008b.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis. 16th ed. Washington, D.C, 1995.

AVAULT, J. W. J. More on fertilization of pond waters. **Aquaculture Magazine**, v. 29, n. 5, p. 54-57, 2003.

BOYD, C. E. **Farm-Level Issues in Aquaculture Certification: Tilapia Report** commissioned by world wild life - US, 2005. 18p.

BOYD, C. E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture Engineering**, v. 20, n. 2, p. 113-132, 1999.

BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura** – Brasil 2008 - 2009. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2011. 100 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (Dispoa). **Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003**: Aprova e oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Seção 1, 2003. 14p.

CARVALHO, E. S.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R.; CRESCÊNCIO, R.; CHAGAS, E. C.; ANSELMO, A. A. S. Uso do probiótico Efinol[®]L durante o transporte de tambaqui

(*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1322-1327, 2009.

CROSS, M. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, 2011.

DENEV, S. A.; STAYKOV, Y.; MOUTAFCHIEVA, R.; BEEV, G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. **International Aquatic Research**, v.1 p. 1-29, 2009.

EL-DAKAR, A. Y.; SHALABY, S. M.; SAOUD, I. P. Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 407-412, 2007.

EL-HAROUN, E. R, GODA, A. M. A. S, CHOWDHURY, K. M. A. Effect of dietary probiotic Biogen[®] supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*(L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473-1480, 2006.

FAO. **Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Roma:WHO, 2002. 50p.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight-length relationship: history, meta-analysis and recommendations. **Journal Applied of Ichthyology**, v. 22, p. 241-253, 2006.

FULTON, T. W. The rate of growth of fishes. **22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland**, v. 3, p. 141-241, 1904.

GATESOUBE, F. J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. **Aquatic Living Resources**, v. 7, n. 4, p. 277–282, 1994.

GHAZALAH, A. A.; ALI, H.M.; GEHAD, E.A.; HAMMOUDA, Y.A.; ABO-STATE, H. A. Effect of probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed low protein diets. **Nature and Science**, v. 8, n. 5, p. 46-53, 2010.

GÜNTHER, J.; JIMENEZ-MONTEALEGRE, R. Effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on the growth and food utilization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and prawn (*Macrobrachium*

rosenbergii) under laboratory conditions. **Revista de Biologia Tropical**, v. 52, n. 4, p. 937-943, 2004.

HIDALGO, M. C.; SKALLI, A.; ABELLÁN, E.; ARIZCUN, M.; CARDENETE, G. Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. **Aquaculture Nutrition**, v.12, p. 256-266. 2006.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.12, p. 5241-5247, 2000.

HONG, H. A.; DUC, L. H, CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 813-835, 2005.

LEGENDRE, M.; KERDCHUEN, N. Larval rearing of an African Catfish *Heterobranchus longifilis* Teleostei, Claridae): effect of dietary lipids on growth survival and fatty acid composition of fry. **Aquatic Living Resources**, v. 8, p. 355-363, 1995.

MACEDO, C. F.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Comunidade planctônica em viveiros de criação de peixes, em disposição sequencial. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 31 n. 1, p. 21-27, 2005.

MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M.; MOTA, F. L. S.; PASSOS NETO, O. P.; SILVA NETO, A. A.; SILVA, A. I. M.; OGAWA, M. Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob à inclusão de probiótico em água mesohalina. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 403-414, 2010.

MARENGONI, N. G.; SANTOS, R. S. Rendimento e composição de filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) cultivados em pesque-pagues. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, n. 211, p. 227-238, 2006.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 2-14, 2010.

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; BYLUND, G.; SALMINEN, S.; LILIUS, E. M. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 5, n. 5, p. 443-452, 2003.

QI, ZIZHONG; ZHANG, XIAO-HUA; BOON, N.; BOSSIER, P. Probiotics in aquaculture of China – Current state, problems and prospect. **Aquaculture**, v. 290, n. 1-2, p. 15–21, 2009.

QUEIROZ, F.; BOYD, C. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. **Journal of the World Aquaculture Society**, v 29, n. 1, p. 67–73, 1998.

RENGPIPAT, S.; TUNYAMUN, A.; FAST, A.W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, n. 2, p. 169–173, 2003.

SAHU, M.; SWARNAKUMAR, N.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 299-308, 2008.

SILLEY, P. Do bacteria need to be regulated? **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p.607–615, 2006.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Limnologia e Piscicultura. **Ciência Zootécnica**, v. 7, n. 1, p. 15-17,1992.

STATISOFT, INC. Statistica (data analysis *software* system) version 7.1, 2009.

SOUZA, D. M.; SUITA, S. M.; LEITE, F. P. L.; ROMANO, A. L.; WASIELESKY, W.; BALLESTER, E. L. C. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. **Aquaculture Research**, p. 1-10, 2011.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y.; LI, W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 501–509, 2010.

5 *Bacillus cereus* VAR. TOYOI E *Bacillus subtilis* C-3102 NO CULTIVO DE TILÁPIA DO NILO DA LINHAGEM GIFT EM VIVEIROS

5.1 Resumo

O presente estudo objetivou avaliar a utilização dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados à dieta para juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), a fim de verificar a colonização do epitélio intestinal e água do cultivo, a influência sobre a microflora bacteriana, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e os parâmetros da qualidade da água. Utilizou-se 1000 juvenis de tilápia do Nilo revertidos, com peso médio inicial de 91,65 g \pm 13,74, distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos com cinco repetições. Foram utilizadas rações comerciais adicionadas de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação dos dois probióticos (BC+BS) e sem a adição de probióticos (SP). Durante o experimento observou-se que os probióticos colonizaram o intestino dos peixes e a água do cultivo, mas não influenciaram os demais parâmetros ($p > 0,05$). Verificou-se que a temperatura média da água ficou em 20,7°C, estando abaixo da faixa ótima para a espécie. O peso e o crescimento específico dos peixes apresentaram variação de 324,81 g dia⁻¹ a 398,51 g dia⁻¹; e 0,62% dia⁻¹ a 0,73% dia⁻¹, respectivamente para BC e BS. A conversão alimentar e o fator de condição ficaram entre 2,40 a 2,92; e 1,83 a 2,01, para BS e BC e o rendimento de filé ficou entre 33,64% para BS e 30,12% para BC+BS. Os probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 utilizados individualmente e combinados realizaram a colonização do epitélio intestinal das tilápias e da água do cultivo, contudo, não influenciaram a microflora bacteriana intestinal, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e os parâmetros de qualidade da água.

Palavras-chave: *Bacillus*, microflora, desempenho zootécnico, probióticos, qualidade da água.

5.2 Abstract

***Bacillus cereus* VAR. TOYO AND *Bacillus subtilis* C-3102 IN THE CULTURE OF NILE TILAPIA GIFT IN PONDS**

This study aimed to evaluate the use of probiotics *Bacillus cereus* var. Toyo and *Bacillus subtilis* C-3102 added to the diet for juvenile Nile tilapia strain of GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) in order to verify the colonization of the gut epithelium and water, the influence on the bacterial microflora, the production performance, the indexes of body composition and parameters of water quality. There were used 1000 juvenile Nile tilapia reversed, with initial average weight of 91.65 ± 13.74 g were randomly allotted to four treatments with five replicates. The commercial feed added 0.5% *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0.5% *B. subtilis* C-3102 (BS), 0.5% of the combination of two probiotics (BC+BS) and without probiotics addition (SP). During the experiment it was observed that the probiotics colonize the gut of fish and water, but did not influence the other parameters ($p > 0.05$). It was found that the average water temperature was 20.7°C and is below the optimal range for the species. The weight and specific growth of the fish changed by $324.81 \text{ g day}^{-1}$ to $398.51 \text{ g day}^{-1}$, and $0.62\% \text{ day}^{-1}$ to $0.73\% \text{ day}^{-1}$, respectively, for BC and BS. The feed conversion ratio and condition factor ranged from 2.40 to 2.92, and 1.83 to 2.01 for BS and BC and fillet yield ranged from 33.64% to 30.12% for BS and BC+BS. The probiotics *B. cereus* var. Toyo and *B. subtilis* C-3102 used individually and in combination colonize the gut epithelium of tilapias and water, however, not influence the gut bacterial microflora, the animal performance, rates of body composition and parameters of water quality.

Keywords: Bacillus, microflora, production performance, probiotics, water quality.

5.3 Introdução

A aquicultura mundial tem crescido significativamente nos últimos anos, tornando-se uma atividade economicamente importante, sendo o setor de produção de alimentos que mais rapidamente cresce no mundo e com maior potencial para atender a demanda crescente de alimentos de origem aquática (FAO, 2010).

Uma característica da aquicultura mundial é a maximização da eficiência de produção para otimizar a rentabilidade. Contudo, a intensificação pode desencadear o surgimento de doenças nos ambientes de criação, devido ao estresse a que os animais ficam submetidos, sendo considerado um grave problema para o setor (BONDAD-REANTASO et al., 2005).

Desta forma, durante as últimas décadas, os antibióticos têm sido utilizados como estratégia tradicional não só para o tratamento de doenças dos peixes, mas também para a melhoria do crescimento e da eficiência da conversão alimentar. No entanto, o desenvolvimento e a disseminação de patógenos resistentes aos antibióticos é uma preocupação que pode impedir a utilização destes quimioterápicos na aquicultura (CABELLO, 2006).

Devido ao risco associado da transmissão aos seres humanos de bactérias resistentes presentes nos ambientes de aquicultura ou até mesmo a transferência de genes de resistência para patógenos humanos (FAO, 2005), desde janeiro de 2006 a União Europeia ratificou a proibição do uso de todos os antibióticos subterapêuticos como agentes promotores de crescimento na produção animal (DENEV et al., 2009).

Desta forma, concomitante a proibição de antibióticos promotores de crescimento houve também o aumento na demanda global por alimentos seguros, o que levou a busca por promotores de crescimento naturais para serem utilizados em organismos aquáticos. Essas novas estratégias em alimentação e saúde na prática da piscicultura, têm recebido muita atenção das empresas e da comunidade científica, resultando em um número crescente de pesquisas para desenvolver novos produtos de suplementação e adição das dietas (BALCÁZAR et al. 2006).

Os probióticos, prebióticos, simbióticos, fitobióticos funcionais entre outros suplementos dietéticos são exemplos destes novos compostos que estão sendo avaliados. No caso dos probióticos, diversos artigos já foram publicados demonstrando efeitos positivos em várias espécies de peixes, incluindo por exemplo a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), entre outros (DENEV et al., 2009).

A Organização Mundial de Saúde define como probióticos os organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO, 2006). Estes aditivos podem atuar de diversas formas como, por exemplo, diminuindo a carga bacteriana por exclusão competitiva, produzindo substâncias inibidoras, estimulando o sistema imunológico dos animais e produzindo enzimas digestivas suplementares (VERSCHUERE et al., 2000).

No entanto, o papel que cada espécie de microorganismos probióticos desempenha individualmente na saúde e na nutrição dos peixes, assim como a forma como isso ocorre ainda são pouco compreendidas, por este motivo as investigações nesta área são importantes para a aquicultura (DENEV et al., 2009).

No presente trabalho objetivou-se avaliar a colonização do intestino pelos probióticos, a influência sobre a microflora bacteriana, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e os parâmetros da qualidade da água, no cultivo de tilápia do Nilo da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), submetidas à rações comerciais adicionadas de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 em viveiros.

5.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (CPAA) localizado na cidade de Toledo-PR, no período compreendido entre 10 de abril a 01 de novembro de 2010, totalizando 201 dias.

Foram utilizados vinte viveiros escavados com paredes em alvenaria e fundo em solo natural com capacidade para 8,4 m³ de água. A água de abastecimento foi proveniente do Rio São Francisco Verdadeiro, através de canais de derivação.

Utilizou-se 1000 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) revertidos, com peso médio inicial de 91,65 g ± 13,74. O experimento foi constituído de quatro tratamentos com cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais com 50 peixes.

A dieta foi constituída de ração comercial extrusada com granulometria de 4 mm contendo 36% de proteína bruta, 6% de extrato etéreo, 3% de fibra bruta, 8% de matéria mineral, 5% de cálcio (máximo) e 2% de fósforo. Foram adicionados à ração 0,5% dos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 na forma liofilizada com 5 x 10⁸ e 1 x 10⁹ esporos g⁻¹, respectivamente, sendo padronizados para proporcionalmente representarem 500 milhões de esporos por grama quando adicionados à ração.

Semanalmente, os probióticos foram adicionados e homogeneizados a ração extrusada, por meio da adição de 2% de óleo de soja para a aderência dos probióticos aos peletes, sendo mantida sob refrigeração.

Desta forma, os quatro tratamentos foram constituídos da ração comercial adicionada de 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação dos dois probióticos (BC+BS) e sem a adição de probiótico (SP). O tratamento isento de probiótico foi composto por ração acrescida do óleo de soja, na mesma proporção utilizada nos demais tratamentos para a inclusão dos probióticos.

O cultivo foi realizado durante as estações do outono, inverno e primavera na região Oeste do Paraná (abril a novembro) e a taxa de arraçoamento diário (TAD) foi realizada em função da biomassa total dos viveiros e da temperatura da água (BOYD, 2005).

A TAD inicial foi de 4%, ocorrendo duas vezes ao dia. Nos meses de junho e julho, devido a queda na temperatura da água que ficou abaixo dos 20 °C, foi corrigida para 0,5%, em agosto para 1% e em setembro para 1,4% e em outubro para 2%, tomando-se o cuidado de realizar a observação visual dos viveiros a fim de verificar se os peixes haviam consumido integralmente a ração ofertada. Nos dias em que a temperatura da água manteve-se abaixo de 15°C a alimentação foi suspensa.

As biometrias foram realizadas mensalmente com amostragem mínima de 20% dos peixes de cada viveiro, onde os indivíduos eram capturados com auxílio de rede de arrasto, a fim de serem pesados e medidos.

Realizou-se o monitoramento da qualidade de água, sendo mensurada diariamente a temperatura, e semanalmente o oxigênio dissolvido (OD), utilizando-se o oxímetro digital modelo Hanna HI 9828, o potencial hidrogeniônico (pH) pelo peagâmetro portátil Hanna HI 8424, a condutividade com o condutivímetro Hanna HI 9835 e a transparência da água com o disco de Secchi

Registrou-se também a média pluviométrica semanal referente ao período experimental, medida em milímetros por metro quadrado, através dos dados coletados pela Estação Agrometeorológica modelo Agrosystem Advantage Pro2, instalada na PUCPR/Toledo.

As análises microbiológicas das amostras de intestino e água do cultivo, ocorridas a cada biometria, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da PUCPR/Toledo, de acordo com os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, propostos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Durante as biometrias, coletou-se aleatoriamente um peixe de cada viveiro para a extração do intestino e 10 mL de água, a fim de, quantificar em unidades formadoras de colônias (UFC) o número de bactérias mesofílicas totais, o número de coliformes totais e a colonização pelos probióticos por grama de intestino e por mililitro de água.

Os peixes coletados foram mantidos vivos em recipiente com água para o transporte ao laboratório de microbiologia, onde foram abatidos através da secção da medula. Realizou-se a higienização do abdômen de cada peixe através de solução com álcool 70%, para o corte abdominal e dissecação do intestino. As amostras de intestino retiradas assepticamente com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica sob a presença da chama, foram pesadas em balança analítica para obtenção de 1 g. Cada amostra foi macerada, com auxílio de pistilos e cápsulas de porcelana e adicionadas a 1 mL de água destilada estéril para homogeneização com equipamento vórtex. Passou-se o material para tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril e seguida foram realizadas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) para o plaqueamento com semeadura em profundidade em cada meio de cultura específico através do método *Pour-Plate*. Nas análises quantitativas para mesófilos totais utilizou-se o Ágar Padrão de Contagem e para coliformes totais o Ágar MacConkey. Para as análises qualitativas (presença/ausência) dos probióticos o meio Ágar Diferenciação de *Bacillus*. A incubação das placas inoculadas ocorreu em estufa microbiológica com temperatura regulada a 27°C por 24 horas.

A contagem de bactérias típicas para mesófilos totais e coliformes totais ocorreu com o auxílio do equipamento contador automático de colônias modelo Phoenix CP 600. As análises qualitativas pertinentes aos probióticos ocorreram pela análise dos aspectos morfológicos das colônias e também pelo método de coloração de Gram com auxílio de microscópio óptico.

Mensalmente foram verificados os índices de desempenho zootécnico através dos dados de cada biometria, sendo determinados os parâmetros de peso médio, biomassa, consumo de ração, conversão alimentar, sobrevivência, ganho em peso diário e taxa de crescimento específico (TCE), definida pela equação $TCE (\%) = [100 \times (\ln \text{Peso médio final} / \ln \text{Peso médio inicial})] / \text{número de dias}$, utilizados por Legendre e Kerdchuen (1995), onde \ln representa o logaritmo neperiano e o fator de condição (Kn) de Fulton (1904) por meio da equação $Kn = W/L^3$, sendo W o peso (g) e L o comprimento total (cm).

Ao final do experimento, para determinação dos índices de composição corporal viscerossomático, hepatossomático, gordura visceral e rendimento de filé, 30 peixes de cada tratamento, mantidos em jejum, foram anestesiados, abatidos e dissecados.

Os valores médios coletados ao longo do experimento através das biometrias foram submetidos à análise de variância por medidas repetidas (MANOVA) e os valores médios coletados somente na última biometria, ou seja, ao término do experimento, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando detectada diferença significativa entre os tratamentos, aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistica 7.1[®] (STATISOFT, 2009).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas (protocolo nº 81/2009 CEEAAP/Unioeste).

5.5 Resultados e discussão

Verificou-se nas análises microbiológicas realizadas mensalmente que os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 colonizaram o intestino dos peixes (Figura 5.1), sendo esta uma característica primordial para os probióticos que é a de sobreviver ao trato gastrointestinal, aderir a parede epitelial e colonizá-la (SAHU et al, 2008).

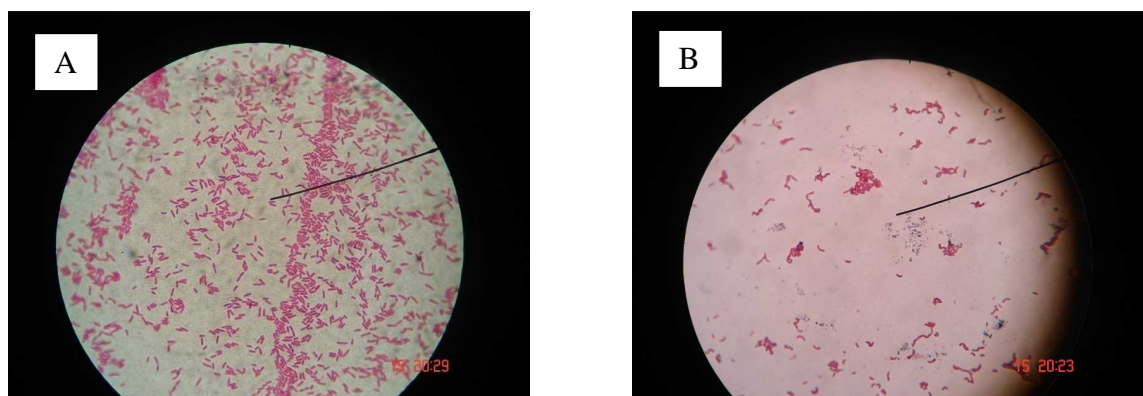


Figura 5.1 Isolamento dos probióticos (A) *Bacillus cereus* var. Toyoi (1000x) e (B) *Bacillus subtilis* C-3102 (1000x) a partir amostras intestinais de juvenis de tilápia do Nilo submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi e 0,5% de *B. subtilis* C-3102.

Mesalhy et al. (2008) realizaram estudos sobre a utilização de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus acidophilus*, como potenciais probióticos, sobre a resposta imune e resistência de tilápia do Nilo e também verificaram que houve colonização intestinal pelos probióticos com recuperação de números significativos de células viáveis.

Observa-se na Figura 5.2 que durante o período experimental o número de bactérias mesofílicas totais e o número de coliformes mantiveram-se constantes, independente

do tratamento, com uma média de $3,39 \times 10^5$ UFC g^{-1} e $4,33 \times 10^3$ UFC g^{-1} de intestino, respectivamente. Considerando cada tratamento ao longo do experimento, nota-se uma estabilidade tanto no número de mesófilos totais, quanto no número de coliformes não havendo diferença significativa entre as biometrias.

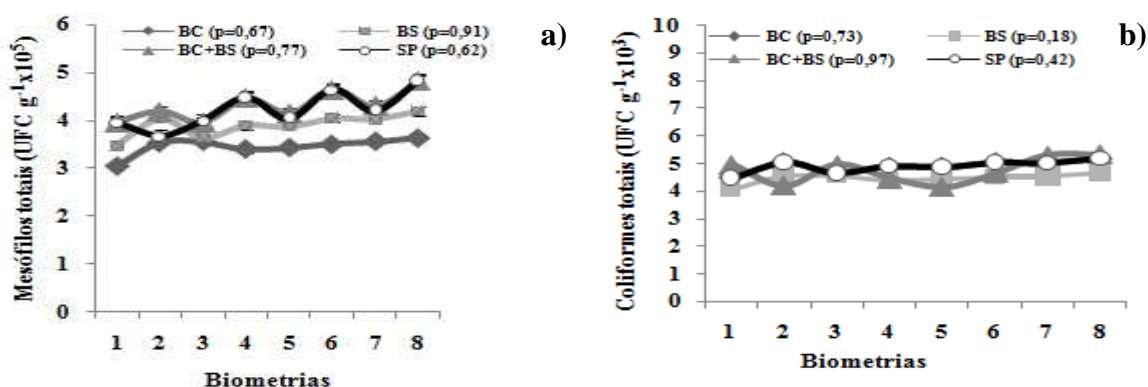


Figura 5.2 Médias da microflora intestinal para mesófilos totais (a) e coliformes totais (b), durante os meses de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Analisando o efeito da adição dos probióticos à ração com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP), dentro das biometrias, verificou-se que os valores médios de mesófilos totais e coliformes totais não diferiram ($p > 0,05$).

Desta forma, a flora bacteriana mesofílica e coliformes totais do intestino não foram influenciados pelos probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 ($p > 0,05$), possivelmente, pelo fato dos microrganismos probióticos serem espécies exógenas, não encontradas naturalmente no intestino de peixes ou mesmo na água, desta forma, os probióticos não chegaram a afetar as demais bactérias presentes no intestino.

Nayak (2010) considera que, por vezes, os probióticos disponíveis comercialmente são relativamente ineficazes pelo próprio fato de serem exógenos, não adaptados ao novo ambiente, podendo ser incapazes de sobreviver ou permanecer viáveis na concentração ótima no intestino. Carnevali et al. (2004), testaram simultaneamente por meio de *Artemia salina* como vetor, duas estirpes de *Lactobacillus fructivorans*, isolados do intestino de adultos de dourada (*Sparus aurata*) e *Lactobacillus plantarum*, isolado de fezes humanas, na alimentação de larvas e alevinos de dourada e verificaram que o tratamento probiótico

influenciou a flora intestinal, com a diminuição do número de patógenos o que reduziu significativamente a mortalidade das larvas e alevinos tratados.

Os probióticos colonizaram o ambiente aquático, mas não influenciaram as populações de microrganismos mesófilos totais e coliformes totais que apresentaram resultados variáveis de acordo com as condições da água (Figura 5.3). O número de bactérias mesofílicas totais manteve-se constante, independente do tratamento, com uma média de $5,45 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ de água. Assim como, o número de coliformes também se manteve constante durante os meses de cultivo com uma média de $2,71 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ de água, observando-se variações em períodos onde ocorreram precipitações pluviométricas devido a diluição da matéria orgânica e dos microrganismos presentes na água.

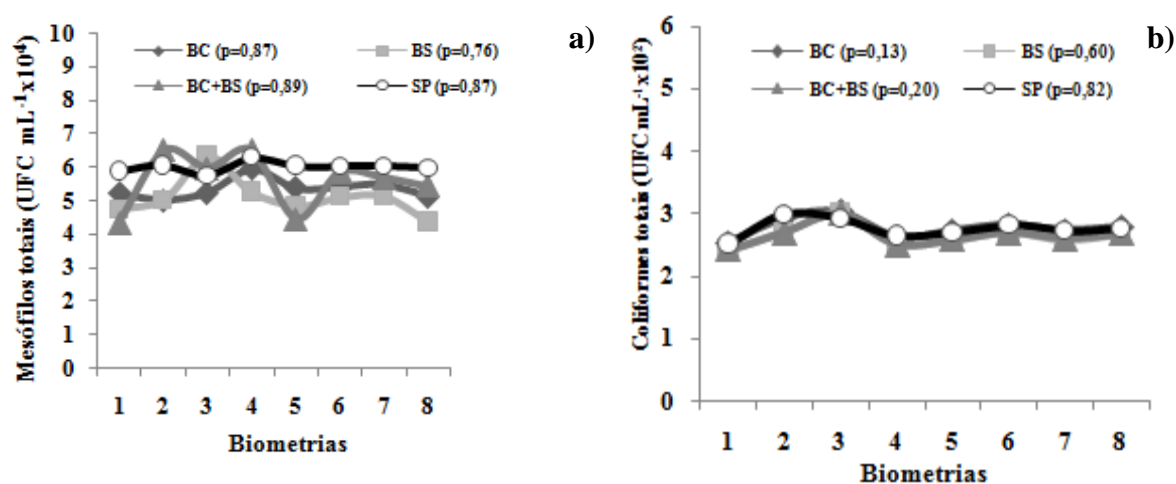


Figura 5.3 Média da microflora da água para mesófilos totais (a) e coliformes totais (b), durante os meses de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Verifica-se na Tabela 5.1 que não houve diferenças significativas quanto aos parâmetros de desempenho zootécnico, sendo que a temperatura média da água que ficou em 20,7°C interferindo no consumo de ração, visto que, em temperaturas inferiores a 25°C, que são características das estações do outono, inverno e primavera na região, há a diminuição do metabolismo da tilápia do Nilo (BOYD, 2005). Este fato pode ter contribuído para a extensão do período de terminação o que resultou em menor ganho em peso médio diário e pior conversão alimentar, em comparação com o modelo estabelecido pela EMATER/PR (HEIN et al., 2004) que preconiza 450g em 150 dias de cultivo para a tilápia do Nilo, com uma conversão alimentar média de 1,5.

Tabela 5.1 Valores médios e desvios padrões dos parâmetros de desempenho zootécnico durante o cultivo de tilápia do Nilo submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Parâmetro	Probiótico				P
	BC	BS	BC+BS	SP	
Peso médio (g)	324,81 ± 66,16	398,51 ± 23,87	354,72 ± 51,45	327,51 ± 68,91	0,17
Comprimento médio (cm)	28,08 ± 1,41	29,22 ± 0,47	28,57 ± 1,17	28,71 ± 0,76	0,41
Biomassa (kg)	13,90 ± 2,82	17,14 ± 1,03	15,17 ± 2,09	13,79 ± 2,61	0,11
Consumo de ração (kg)	26,33 ± 5,03	29,98 ± 1,65	27,30 ± 3,43	25,36 ± 5,56	0,37
Conversão alimentar	2,92 ± 0,41	2,40 ± 0,24	2,62 ± 0,38	2,80 ± 0,23	0,12
Sobrevivência (%)	85,60 ± 0,89	86,00 ± 0,00	85,60 ± 0,89	84,50 ± 3,00	0,51
Crescimento específico (% dia ⁻¹)	0,62 ± 0,11	0,73 ± 0,03	0,67 ± 0,07	0,63 ± 0,11	0,19
Ganho em peso diário (g)	1,16 ± 0,33	1,53 ± 0,12	1,31 ± 0,26	1,17 ± 0,34	0,17
Fator de condição (Kn)	2,01 ± 0,00	1,83 ± 00	2,04 ± 00	1,96 ± 00	0,31

Ao final do experimento (Tabela 5.1) o peso, o ganho em peso diário e o crescimento específico dos peixes apresentaram variações entre 324,81 g ± 66,16 a 398,51 g ± 23,87, 1,16 g dia⁻¹ ± 0,33 a 1,53 g dia⁻¹ ± 0,12 e 0,62 % dia⁻¹ ± 0,11 a 0,73 % dia⁻¹ ± 0,03, respectivamente para os tratamento adicionados de *B. cereus* var. Toyoi (BC) e *B. subtilis* C-3102 (BS).

Marengoni et al. (2010) avaliando o desempenho produtivo e a proporção sexual de alevinos de tilápia vermelha (*Oreochromis* sp., linhagem Saint Peter) em águas mesohalinas a 0,5 e 1,0% sob inclusão de níveis crescentes de um mix probiótico contendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus* (0, 5, 10 e 15 g de probiótico kg⁻¹ de ração comercial) também verificaram ao término do experimento que os parâmetros zootécnicos não foram influenciados pelos probióticos. Já Aly et al. (2008), testando a atividade probiótica de *Bacillus subtilis* combinado com *Lactobacillus acidophilus*, em tilápia do Nilo verificaram resultados significativos para taxa de sobrevivência e o ganho em peso corporal em relação ao tratamento controle, diferentemente do observado no presente estudo.

A utilização dos probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 não influenciou ($p > 0,05$) os índices de sobrevivência que variaram entre 84,5% e 86%, respectivamente para *B. subtilis* C-3102 (BS) e para o tratamento sem a adição de probiótico (SP), sendo satisfatório, considerando-se que durante o período experimental as temperaturas mínimas da água registradas nos dias de inverno chegaram a 10°C.

Segundo Sahu (2008), a efetividade dos probióticos passam a ser mais evidentes em situações de cultivo onde os animais ficam expostos a níveis de estresse ou desafios. Contudo, no presente experimento a temperatura da água constituiu em fator estressante para os peixes,

visto que, a temperatura média ficou abaixo da faixa ótima para a tilápia do Nilo, e em determinados momentos esteve muito próxima a temperatura letal que seria abaixo de 10°C. Mesmo assim, os probióticos utilizados não influenciaram os índices de produtividade (Tabela 5.1).

Desta forma, os impactos sobre o desempenho zootécnico ainda não são comumente observados como ponto forte dos probióticos testados em peixes. Contudo, outros aspectos envolvendo estes microrganismos apontam para resultados mais promissores relacionados a saúde e o bem-estar dos peixes, como parâmetros imunológicos e resistência a doenças, a exemplo dos trabalhos publicados por Ortuno et al. (2002), Raida et al. (2003), Mesalhy et al. (2008), Wang et al. (2008), Pirarat et al. (2006), Taoka et al. (2006), Abd El-Rhman et al. (2009), Aly et al. (2008), He et al. (2009), Nayak (2010), entre outros.

Tabela 5.2 Valores médios e desvios padrões dos índices víscerosomático, hepatosomático, gordura visceral e rendimento de filé de tilápias do Nilo GIFT, submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Índice (%)	Probiótico				p
	BC	BS	BC+BS	SP	
Viscerosomático	12,87 ± 4,36	9,65 ± 4,18	13,27 ± 1,15	9,92 ± 3,64	0,272
Hepatosomático	1,45 ± 0,17	1,65 ± 0,20	1,49 ± 0,16	1,57 ± 0,07	0,227
Gordura visceral	1,66 ± 0,31	1,67 ± 0,40	1,88 ± 0,33	1,71 ± 0,35	0,714
Rendimento de file	30,60 ± 2,40	33,64 ± 4,61	30,12 ± 2,13	33,18 ± 4,11	0,305

Os índices víscerosomáticos, hepatosomáticos, de gordura visceral e rendimento de filé, não foram influenciados ($p > 0,05$) pela utilização dos probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (Tabela 5.2). Quanto ao rendimento de filé os valores variaram de 30,12% ± 2,13 a 33,64% ± 4,61 em relação à carcaça total, estando dentro da faixa encontrada por Marengoni e Santos (2006), que avaliaram tilápias provenientes de pesque-pague diferentes, obtendo um resultado entre 28,47% a 34,1%.

O peso visceral dos peixes submetidos aos probióticos *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 não foi influenciado, assim como o peso do fígado. A deposição de gordura visceral variou entre 1,66% ± 0,31 e 1,88% ± 0,33, respectivamente para *B. cereus* var. Toyoi (BC) e combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS); e o rendimento de filé variou entre 30,12% ± 2,13 e 33,64% ± 4,64, respectivamente para a combinação dos dois probióticos (*B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102) (BC+BS) e *B. subtilis* C-3102 (BS).

Analisando a Tabela 5.3, verifica-se as médias registradas dos parâmetros da qualidade da água para temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e transparência durante o período experimental que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Os valores médios para oxigênio dissolvido, pH, condutividade e transparência foram de $4,7 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,80$, $7,4 \pm 0,20$, $46,66 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 3,21$ e $40,99 \text{ cm} \pm 3,51$, respectivamente, sendo considerados valores aceitáveis para um bom desempenho do cultivo desta espécie.

Tabela 5.3 Valores médios e desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água durante o período experimental no cultivo de tilápia do Nilo, linhagem GIFT submetidos às rações adicionadas com 0,5% de *B. cereus* var. Toyoi (BC), 0,5% de *B. subtilis* C-3102 (BS), 0,5% da combinação de *B. cereus* var. Toyoi e *B. subtilis* C-3102 (BC+BS) e sem adição de probióticos (SP).

Parâmetro	Probiótico				p
	BC	BS	BC+BS	SP	
Temperatura média (°C)	$20,4 \pm 1,9$	$20,8 \pm 2,1$	$20,7 \pm 1$	$20,8 \pm 2,2$	0,963
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	$4,7 \pm 1,9$	$5,0 \pm 1,9$	$4,4 \pm 1,7$	$4,9 \pm 2,8$	0,426
pH	$7,5 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,30$	$7,4 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,3$	0,896
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$44,19 \pm 7,5$	$44,92 \pm 6,6$	$43,53 \pm 6,9$	$44,8 \pm 7,0$	0,984
Transparência (cm)	$41,2 \pm 7,0$	$39,1 \pm 5,68$	$39,6 \pm 6,68$	$37,2 \pm 6,74$	0,357

Contudo, devido à época do ano em que o experimento foi realizado, a temperatura média da água registrada foi de $20,7^\circ\text{C} \pm 0,30$, estando abaixo da temperatura ideal preconizada para um bom desempenho da tilápia do Nilo que é de 25°C a 30°C , conforme Boyd (2005).

5.6 Conclusão

Os probióticos *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Bacillus subtilis* C-3102 adicionados individualmente e combinados a ração comercial na proporção de 0,5% para tilápia do Nilo da linhagem GIFT, colonizaram o intestino dos peixes e a água dos viveiros, contudo, não influenciaram a microflora bacteriana intestinal, o desempenho zootécnico, os índices de composição corporal e os parâmetros da qualidade da água.

5.7 Referências

ALY, S. M.; AHMED, Y.; GHAREEB, A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance

of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 128-136, 2008.

BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, R. J.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, n. 3-4, p. 249-272, 2005.

BOYD, C. E. **Farm-Level Issues in Aquaculture Certification: Tilapia Report** commissioned by world wild life - US, 2005. 18p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (Dispoa). **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**: Aprova e oficializa os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Seção 1, 2003. 14p.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CARNEVALI, O.; ZAMPONI, M. C.; SULPIZIO, R.; ROLLO, A.; NARDI, M.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; CAGGIANO, M.; POLZONETTI, A. M.; CRESCI, C. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. **Aquaculture International**, v. 12, n. 4-5, p. 377-386, 2004.

DENEV, S. A.; STAYKOV, Y.; MOUTAFCHIEVA, R.; BEEV, G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. **International Aquatic Research**, v.1 n. 4, p. 1-29, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture**. Roma: FAO Fisheries Technical Paper, v. 469, 2005. 98p.

FAO. **Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Roma: WHO, 2006. 50p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA)**. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010. 196p.

FULTON, T. W. The rate of growth of fishes. **22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland**, v. 3, p. 141-241, 1904.

HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RINGØ, E.; YOON, I. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂) cultured in cages. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 99-107, 2009.

HEIN, G.; PARIZOTTO, M. L. V.; BRIANESE, R. H. **Referência modular para o Oeste do Paraná** – agricultor familiar, semi-intensivo, tanques escavado. Toledo: EMATER, 2004.

MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M.; MOTA, F. L. S.; PASSOS NETO, O. P.; SILVA NETO, A. A.; SILVA, A. I. M.; OGAWA, M. Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob à inclusão de probiótico em água mesohalina. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 403-414, 2010.

MARENGONI, N. G.; SANTOS, R. S. Rendimento e composição de filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) cultivados em pesque-pagues. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, n. 211, p. 227-238, 2006.

MESALHY, A. S. M.; YOUSEF, A. G. A.; GHAREEB, A. A. A; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 28-136, 2008.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 2-14, 2010.

ORTUNO, J.; CUESTA, A.; RODRIGUEZ, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Oral administration of yeast *Saccharomyces cereviceae* enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 85, n. 1-2, p. 41-50, 2002.

PIRARAT, N.; KOBAYASHI, T.; KATAGIRI, T.; MAITA, M.; ENDO, M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology Immunopatology**, v. 113, n. 3-4, p. 339-347, 2006.

RAIDA, M. K.; LARSEN, J. L.; NIELSEN, M. E.; BUCHMANN, K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). **Journal Fish Disease**, v. 26, n. 8, p. 495-498, 2003.

SAHU, M.; SWARNAKUMAR, N.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 299-308, 2008.

STATISOFT, INC. **Statistica (data analysis software system) version 7.1**, 2009.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J. Y.; KIM, S.; PARK, S.; YOSHIKAWA, T.; SAKATA, T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 4, p. 755-767, 2006.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

WANG, Y. B.; TIAN, Z. O.; YAO, J. T.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 203-207, 2008.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tilapicultura é uma das atividades agropecuárias de maior crescimento nos últimos anos, impulsionado por seu desempenho zootécnico e reprodutivo. Desta forma, a inclusão de novas tecnologias a fim melhorar os resultados na produção e ao mesmo tempo diminuir os impactos ambientais devem ser levados em consideração.

A utilização de probióticos na aquicultura aos poucos ganha cada vez mais força, visto que, o estímulo a multiplicação de bactérias benéficas no ambiente intestinal e na água, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais aos peixes, dentre outros efeitos benéficos podem trazer um avanço tecnológico e contribuir com a sustentabilidade do setor.

Embora a ciência da nutrição de peixes esteja longe de estabelecer um padrão geral a necessidade do desenvolvimento de produtos de baixo impacto ambiental que melhorem a eficiência de produção, reduzam custos e permitam produtos mais saudáveis aos consumidores são objetivos que deverão ser alcançados através da pesquisa.