

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

DANIELE MENEZES ALBUQUERQUE

Bacillus cereus var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 em dietas para alevinos de
tilápia do Nilo, linhagem GIFT

Toledo

2010

DANIELE MENEZES ALBUQUERQUE

Bacillus cereus var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, 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: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Ph.D. Nilton Garcia Marengoni

Toledo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELE MENEZES ALBUQUERQUE

Bacillus cereus var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, 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. Ph.D. Nilton Garcia Marengoni
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 10/02/2011

Local de defesa: mini auditório do *Campus* de Toledo

Aos meus pais, Evânio e Luciene, que apesar da distância, sempre me apoiaram e estiveram presentes em mente e coração.

*Ao meu namorado Gleidson pela paciência, atenção,
carinho e, principalmente amor em todas as etapas
vencidas durante a ausência.*

*À minha irmã, Daiene, pelo incentivo, atenção,
aliviar e manter o equilíbrio nos momentos difíceis
durante a minha jornada.*

DEDICO

"O êxito na vida não se mede pelo que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho"

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele não teria conseguido o meu objetivo;

Em especial, ao Prof. Ph.D. Nilton Garcia Marengoni que além de me orientar, sempre me aconselhou com muito carinho e dedicação incondicionalmente em todas as horas durante esta jornada. Não somente como educador, mas também como um amigo que por diversas vezes foi minha família, no qual levarei como lembrança eterna destes momentos enquanto fui sua orientanda;

À Médica Veterinária Adelaide Marina Schaedler, amiga, conselheira, família, companheira em todas as adversidades nesta terra que não fazia parte da minha vida, mas que com ela, eu aprendi que eu posso diminuir um pouco a angústia na ausência dos meus entes queridos;

À Bióloga Elaine Fernandes Celestino, minha excepcional melhor amizade na qual poderia ter conquistado durante esta jornada. Um anjo que me ajudou em momentos no qual eu pensei que não conseguiria alcançar meu objetivo. Não tenho palavras pela a amizade que sempre foi tão forte;

Aos amigos de projeto, Ilson Mahl, Milton César, Faline Arantes, Daniele Rossetto, Alan Carlos Gonçalves, Ana Paula Chambo e Katiane Pimenta pelo auxílio prestado durante as análises do experimento e que nunca me deixaram sozinha nos momentos mais difíceis;

Aos grandes amigos Amanda Furjan Rial, Talita Gabriela Dieterich, Edionei Maico Fries, Eduardo Antônio Sanches, Lucélia Tessaro, Cristina Viana Salles, Cássia Fernanda Yano e Daiany Cristina Macagnan pelos momentos de descontração, troca de experiências, felicidades, durante o mestrado;

Aos sempre eternos amigos que me apoiaram à distância, Prof. Ph.D. Masayoshi Ogawa, Lílian Mota, Ana Irene Martins, Marina Cavalcante, Érbeli Sampaio, Flávia Oliveira, Paulo Justino, Ana Paula Vasconcelos, Wanessa da Silva, Alessandra Silva, Bruno Raphael, Marcelo da Costa, Aline Viana, Bruno Braulino, Frederico Batista e Vitor Matheus.

Aos professores Nyamien Yahaut Sebastien, Wilson Rogério Boscolo e Robie Allan Bombardelli por todos os auxílios prestados, bem como, orientações e sugestões prestadas e seguidas durante a execução do experimento;

Às técnicas de laboratório do Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná *Campus* Toledo, Ângela Gubiani, Jackeline e Maristela que viabilizaram as atividades desenvolvidas durante a execução do experimento;

Aos grupos de pesquisa da Unioeste, Gesoma, GETECH, GERPEL, Gemaq, Latraac pelo empréstimo de equipamentos e infraestrutura utilizada durante a execução do experimento;

À Profa. Dra. Maristela Cavicchioli Makrakis, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, por sempre administrar com excelência, segurança, tranquilidade e ser atenciosa com todos os acadêmicos do referido mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que todas as etapas fossem cumpridas durante o mestrado.

RESUMO

Objetivou-se avaliar qualidade de água, desempenho produtivo, sexagem fenotípica, índices corpóreos, composição centesimal, macro micronutrientes, custos operacionais parciais (COP) e microbiologia intestinal de tilápia do Nilo, linhagem GIFT, alimentadas com ração formulada com probióticos *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102, durante 113 dias de cultivo nas fase de reversão sexual e alevinagem. Foram utilizados 1200 pós-larvas com peso médio inicial de $24,7 \pm 0,50$ mg. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em um sistema de 24 aquários de $0,03 \text{ m}^3$ num delineamento inteiramente casualizado composto por três tratamentos e oito repetições, constituído por dois probióticos e, tratamento isento de probiótico. Inicialmente na fase de reversão sexual considerou-se uma unidade experimental um aquário contendo 50 peixes com volume útil de $0,03 \text{ m}^3$ e, na fase de alevinagem um aquário contendo 30 peixes. Os dados de desempenho produtivo, índices corporais, composição centesimal, macro e micronutrientes, COP e microbiologia intestinal foram submetidos à ANOVA a 5% de significância e, sexo fenotípico foi submetido ao Qui-Quadrado (χ^2). Não houve associação entre a proporção de machos e fêmeas ($\chi^2 = 1,42$; $p = 0,4926$) e a inclusão de probióticos. Não houve diferenças ($p > 0,05$) nos índices corporais, composição centesimal dos peixes alimentados com probióticos ou ausentes nas rações. A inclusão de quaisquer dos probióticos foi influenciada ($p < 0,05$) sobre valores de cálcio na carcaça dos alevinos em relação aos peixes ausentes de probióticos. O COP foi afetado significativamente ($p < 0,05$) para o tratamento que continha na sua formulação *Bacillus subtilis* em comparação aos peixes que não foram alimentados de probióticos. Houve uma maior colonização por bactérias totais e coliformes totais na fase de alevinagem em relação à fase de reversão sexual ($p < 0,05$). A utilização de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus* melhora o desempenho produtivo e custos operacionais parciais e, não afetam negativamente os índices corpóreos, microbiologia intestinal, composição centesimal, macro e micronutrientes no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, linhagem GIFT.

Palavras-chave: alevinagem, custos, índices corpóreos, sexo fenotípico, tilapicultura.

Bacillus cereus var. *Toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in diets of fingerlings of Nile tilapia, GIFT strain

ABSTRACT

The objective was to evaluate the water quality, performance, phenotypic sexing, corporal indexes, macro and micro composition, proximate composition, partial operating cost of Nile tilapia, GIFT strain, fed with diets formulated with probiotic *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102, during 113 days of cultivation in the sex reversal and nursery. Had been used 1200 post-larvae with an average initial weight of 24.7 ± 0.50 mg. Fish were randomly distributed to a system of 24 aquaria of 0.03 m^3 in a completely randomized design consisting of three treatments and eight replications, consisting of two probiotics and without probiotic. Initially during the sex reversal was considered an experimental unit, a aquarium containing 50 fish with a volume of 0.03 m^3 and during the nursery an aquarium with 30 fingerlings. The data of performance, body indices, indexes, macro and micro composition, partial operation costs were subjected to ANOVA with 5% significance level, and sex ratio data were subjected to chi-square (χ^2). Except for the specific growth, the fishes of nursery showed values of performance higher than sexual reversion. There was no association between the proportion of males and females ($\chi^2=1.42$, $p=0.4926$) and inclusion of the probiotics. There were no differences ($p<0.05$) in the indexes, proximate composition of the fishes fed with probiotics or absent in the rations. The inclusion of any of probiotics was influenced ($p<0.05$) on calcium levels under carcass of the juveniles in relation to fish absent of probiotics. The COP was affected significantly ($p<0.05$) for the treatment with *Bacillus subtilis* in its formulation in comparison to fish that were not fed probiotics. There was an increased colonization by bacteria and total coliforms during the nursery in relation to sex reversal ($p<0.05$). The utilization of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* improves the performance and partial operating cost, and doesn't negatively affect the corporal indexes, intestinal microbiology, proximate composition, macro and micronutrients in the cultivate fingerlings of Nile tilapia, GIFT strain.

Keywords: fingerlings, corporal indexes, cost, phenotypic sexing, tilapia culture.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Disponível em: <http://www.vet.ufmg.br/editora/arquivo-brasileiro-de-medicina-veterinaria-e-zootecnia>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual e química das rações experimentais para alevinos de tilápia do Nilo cultivados durante a fase de reversão sexual e alevinagem.....	17
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de desempenho produtivo observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com probióticos durante a fase de reversão sexual e alevinagem.....	22
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de desempenho produtivo observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com diferentes probióticos durante a fase de alevinagem.....	23
Tabela 4. Valores médios e desvio padrão do peso final (PF), comprimento final (CF), índice hepatossomático (IHS), índice viscerossomático (IVS), e gordura visceral (IGV), observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo probióticos.....	25
Tabela 5. Números de peixes analisados, valores médios e desvio padrão (s) de peso corporal, comprimento total (TL) e fator de condição (Kn), observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com diferentes probióticos.....	27
Tabela 6. Valores médios e desvio padrão da composição centesimal (%) na matéria seca da carcaça de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes probióticos.....	28
Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de macronutrientes (g/kg) e micronutrientes (mg/kg) da carcaça de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes probiótico.....	29
Tabela 8. Valores médios e desvio padrão de bactérias totais e coliformes totais e presença/ausência de <i>Bacillus</i> dos intestinos de alevinos de tilápias do Nilo alimentadas com diferentes probióticos entre os períodos de reversão sexual e alevinagem.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), saturação de OD (%) e pH da água de cultivo durante a fase de reversão sexual de alevinos de tilápia do Nilo.....	20
Figura 2. Sobrevivência e peso médio dos alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> e ração ausente de probióticos, durante as biometrias quinzenais.....	24
Figura 3. Curvas de regressão para peso (g) e comprimento (cm) de alevinos de tilápia do Nilo não submetidos a probióticos (a), <i>Bacillus subtilis</i> (b) e <i>Bacillus cereus</i> (c).....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Fase de reversão sexual – Experimento I	16
2.2 Fase de alevinagem – Experimento II.....	16
2.3 Protocolo experimental da fabricação das dietas utilizadas.....	16
2.4 Índices biométricos dos peixes	18
2.5 Monitoramento da qualidade de água	18
2.6 Índices corporais dos peixes.....	18
2.7 Efetividade da reversão sexual dos peixes	19
2.8 Composição centesimal da carcaça eviscerada dos peixes	19
2.9 Composição de macro e micronutrientes dos peixes	19
2.10 Análise microbiológica intestinal dos peixes.....	19
2.11 Análise estatística	20
2.12 Aprovação no comitê de ética.....	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Monitoramento e qualidade de água – Fase de reversão sexual.....	21
3.2 Monitoramento e qualidade de água – Fase de alevinagem.....	22
3.3 Desempenho zootécnico dos peixes – Fase de reversão sexual	22
3.4 Desempenho zootécnico dos peixes – Fase de alevinagem	24
3.5 Índices corporais dos peixes.....	26
3.6 Efetividade da reversão sexual dos peixes	27
3.7 Composição centesimal da carcaça eviscerada dos peixes	28
3.8 Composição de macro e micronutrientes dos peixes	29
3.9 Análise microbiológica intestinal dos peixes.....	31
4 CONCLUSÕES	33
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma importante atividade agropecuária, especialmente a tilapicultura, no qual gera emprego e renda e, tem sido considerada uma forte cadeia na produção de alimentos no Brasil. Durante as fases de reversão sexual e alevinagem, em produções de grande escala comercial, no qual demandam uma grande densidade de peixes estocados é comum o surgimento de doenças ocasionadas pelo estresse durante o cultivo, ocorrendo grandes mortalidades e prejuízo ao produtor.

A minimização destes problemas tem fomentado várias pesquisas nos últimos anos, visando substituir os antibióticos na produção animal, especialmente em cultivos de organismos aquáticos (Nayak, 2010). A FAO/WHO (2002) definem probióticos como microorganismos vivos que, administrados em doses adequadas geram benefícios ao animal hospedeiro.

Os probióticos vêm sendo destaque na indústria em todo mundo, sua efetividade como produto promotor de crescimento possui algumas características tais como, conseguir sobreviver ao trato gastrointestinal, aderir células da parede intestinal, reduzir ou prevenir patógenos, não ser patogênico ao hospedeiro, além de sobreviver a longos períodos de estocagem e armazenagem (Saad, 2006).

Segundo Nayak (2010) são utilizadas diversas bactérias probióticas para piscicultura, exemplificando o gênero *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*) e até mesmo algumas espécies do gênero *Aeromonas* e outros grupos de bifidobactérias. Dependendo do modo de ação em que atuam no hospedeiro, os probióticos possuem propriedades únicas como capacidade de melhorar a imunidade do animal e não se deve atribuir a mesma função para todas as espécies de bactérias.

A utilização de bactérias em organismos aquáticos influencia o meio externo e os prováveis patógenos sobre animal cultivado, devido ao constante contato através dos processos de osmorregulação e alimentação. Deve-se considerar que alguns probióticos desempenham ações não somente no animal, mas também conjuntamente com o meio em que o organismo é cultivado (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

Conforme Balcázar et al. (2006) os probióticos são comercializados na forma liofilizada ou na forma líquida, e podem ser ministrados pulverizados no alimento, adicionados à água de cultivo ou adicionados na dieta artificial e, em alimentos vivos. Os probióticos também podem ser administrados com uma única espécie de bactéria, ou em adição a outras espécies ou até mesmo outros gêneros (Timmerman et al., 2004).

Os *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* são ótimos candidatos a probióticos utilizados em organismos aquáticos, pois segundo El-Haroun et al. (2006) as espécies dessas bactérias podem ser liofilizadas e, portanto, são capazes de sobreviver a altas temperaturas como por exemplo, após o processo de peletização, pode ser armazenado em temperatura ambiente sem qualquer efeito deletério e, resistem à baixo pH que podem chegar intactos ao intestino delgado (Cutting, 2010).

Além disso, estas bactérias gram positivas podem atuar na melhoria da qualidade de água, oxidando matéria orgânica e CO₂ particulado. Diversas pesquisas relatam que este gênero pode aumentar o ganho em peso, diminuir a incidência de patógenos em organismos aquáticos (Farzanfar, 2006; Kesarcodi-Watson et al, 2008).

Williams et al. (2009) reportam que *Bacillus cereus* são bactérias gram positivas da família *Bacillaceae* formadora de esporos, anaeróbias facultativas com largas células vegetativas que podem crescer em temperaturas entre 8-55°C, porém seu crescimento ótimo ocorre em condições entre 28-35°C, nos quais seus esporos podem ser isolados de solos, água e vegetais sendo ainda encontrado na flora intestinal de animais.

Em sistemas intensivos a ração é a única fonte de alimento dos peixes, portanto, é necessário utilizar rações balanceadas e com ingredientes com alto valor biológico e nutrientes digestíveis (Cyrino et al., 2010).

Tendo em vista a necessidade de minimizar o lançamento de efluentes oriundos dos cultivos de peixes, os probióticos são alternativas para a solução deste problema, pois alguns trabalhos envolvendo organismos aquáticos (El-Haroun et al., 2006; Marengoni et al., 2010) argumentam que estes microorganismos podem melhorar a conversão alimentar, resultando assim em menor quantidade de resíduos no meio ambiente e um menor custo ao produtor.

A maioria dos trabalhos utilizam os probióticos diretamente na água, em adição aos óleos vegetais como forma de agregar esses microorganismos com os ingredientes ou zooplânctons para servir de aditivo indireto na alimentação.

Poucos são os trabalhos científicos que elucidam a utilização de probiótico em rações formuladas para peixes, portanto, são necessárias mais pesquisas neste setor de estudo, que é um dos elos considerados básicos na tilapicultura.

Desta forma, este estudo teve como objetivos avaliar o desempenho produtivo, sexo fenotípico, índices corpóreos, composição centesimal, macro e micronutrientes, custos operacionais parciais e microbiologia intestinal de alevinos de tilápia do Nilo, linhagem GIFT, alimentadas com rações formuladas sob inclusão dos probióticos *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 no período de reversão sexual e alevinagem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fase de reversão sexual – Experimento I

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná durante o período de março a abril de 2010, num total de 30 dias. Foram utilizadas 1200 pós-larvas com peso médio inicial de $24,7 \pm 0,50$ mg adquiridas em uma piscicultura comercial localizada no município de Palotina-PR.

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 aquários de 30 L num delineamento inteiramente casualizado composto por três tratamentos e oito repetições, constituído por dois probióticos e um tratamento isento de probiótico.

Considerou-se uma unidade experimental um aquário com volume útil de $0,03 \text{ m}^3$ contendo 50 pós-larvas.

2.2 Fase de alevinagem – Experimento II

Foram utilizados os peixes oriundos da fase de reversão sexual (experimento I) para a fase de alevinagem (experimento II). Ao final do experimento I, foram retirados os 20% dos peixes maiores e menores em torno da média do peso individual médio de cada unidade experimental com intuito de homogeneizar o lote para a fase de alevinagem. No início do período de alevinagem considerou-se uma densidade de estocagem de 30 peixes/aquário.

O delineamento experimental da fase II foi o mesmo que a fase I, considerando um esquema inteiramente casualizado, composto por três tratamentos e oito repetições, constituído por dois probióticos e um tratamento isento de probiótico.

2.3 Protocolo experimental da fabricação das dietas utilizadas

Utilizaram-se dois produtos comerciais como promotores de crescimento, um probiótico contendo espécies da bactéria *Bacillus subtilis* C-3102 e o outro *Bacillus cereus* var. *Toyo*i (Tabela 1). As rações foram confeccionadas no Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (CPAA) utilizando a metodologia adaptada de Pezzato et al. (2002), no qual, os ingredientes sólidos foram moídos separadamente e misturados aos ingredientes líquidos de maneira a apresentarem uma mistura homogênea. Nas rações que continham na fórmula probiótico, acrescentou-se 1% do produto no momento da mistura dos ingredientes.

A peletização das rações foi efetuada umedecendo-as com água numa temperatura em torno de 55°C e o processamento em moedor de carne para formação dos pellets. A secagem das rações foi realizada numa estufa de recirculação forçada a 55°C durante um período de 24 horas, no Laboratório de Tecnologia de Transformação de Alimentos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), *Campus* de Toledo. Os pellets foram triturados e as rações foram acondicionadas em sacos plásticos pretos para evitar a oxidação dos ingredientes.

Durante um período de 30 dias, os animais foram revertidos sexualmente adicionando nas rações experimentais o andrógeno sintético 17- α -metiltestosterona, por volatilização de álcool etílico numa concentração de 60 mg kg⁻¹. Os peixes foram alimentados *ad libitum* seis vezes ao dia e, ao final do dia, todos os aquários foram sifonados para retirar possíveis resíduos de fezes e sobras de ração.

Tabela 1. Composição percentual e química das rações experimentais para alevinos de tilápia do Nilo cultivados durante a fase de reversão sexual e alevinagem.

Ingrediente	Bactéria		
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Farelo de soja	44,91	44,25	44,25
Farinha de peixe	24,50	24,65	24,65
Farelo de milho	24,13	23,07	23,07
Probiótico	-	1,00	1,00
Premix MV ⁽¹⁾	1,00	1,00	1,00
DL-metionina	0,21	0,21	0,21
Antioxidante	0,02	0,02	0,02
Óleo de soja	3,71	4,28	4,28
Fosfato bicálcico	2,12	2,13	2,13
Calcário calcítico	-	0,01	0,01
Sal	0,30	0,30	0,30
Total	100	100	100
Nutriente	(%)		
Amido	15,04	16,29	16,29
Cálcio	1,55	1,44	1,44
Energia digestível (tilápia)	3296,00	3272,00	3272,00
Fibra bruta	3,22	2,96	2,96
Fósforo total	1,11	1,00	1,00
Gordura	6,565	5,92	5,92
Lisina total	2,35	2,39	2,39
Metionina total	0,87	1,05	1,05
Proteína bruta	37,53	37,24	37,24

⁽¹⁾Premix mineral vitamínico: Composição por kg de produto: ferro=10,312 mg; manganês=6,875 mg; cobre=1,100 mg; zinco=16,500 mg; iodo=137 mg; cobalto=82,50 mg; selenio=124,00 mg; cromo=68,75 mg; vit. A=1.100,000 UI; vit. D3=344,000 UI; vit. E=27,500 mg; vit. K=1,375 mg; vit. C=41,250 mg; biotina=130,50; colina=75,625 mg; vit. B9 fólico=825,00 mg; inositol=27,500 mg; niacina=13,750 mg; vit. B5 pantoten=6,875 mg; vit. B6 piridox=2,063 mg; vit B2 rivo flav=2,750 mg; vit. B1 tiamina=2,750 mg e vit. B12 clano co=4,120 mg.

2.4 Índices biométricos dos peixes

Ao final da fase de reversão sexual e alevinagem experimental foram analisados os dados de desempenho produtivo de peso final, ganho em peso = (peso final – peso inicial), conversão alimentar aparente = (quantidade de ração consumida/ganho em biomassa) e sobrevivência. A taxa de crescimento específico (TCE) e o fator de condição de Fulton, chamado isométrico (Kn) foram calculados conforme adaptações de Weatherley (1972) e Vazoller (1996) para calcular o grau de higidez dos indivíduos e com isso refletir as condições alimentares recentes, através das equações, $TCE = \{[(\ln PF - \ln PI)/n^\circ \text{ de dias}] \times 100\}$; e $Kn = [(\text{peso corporal}/\text{comprimento corporal}^3) \times 100]$ em que: $\ln$ = logaritmo natural; PF = peso final; PI = peso inicial.

2.5 Monitoramento da qualidade de água

Semanalmente foram monitorados as variáveis dos parâmetros físicos e químicos da água como oxigênio dissolvido e temperatura com oxímetro digital com auxílio de potenciômetros dos modelos YSI 550A, pH HI 8314 e condutividade HI 9033 da marca Hanna Instruments®, respectivamente.

2.6 Índices corporais dos peixes

As análises dos parâmetros corporais foram realizadas no Laboratório de Apoio Técnico da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. De cada unidade experimental ao final da fase de alevinagem, foram coletados aleatoriamente dez peixes para determinação dos parâmetros corporais de fígado, gordura visceral e vísceras totais.

Os pesos das vísceras, da gordura visceral e do fígado foram obtidos após a retirada das vísceras para determinação dos índices viscerossomático, hepatossomático e de gordura visceral, respectivamente, por meio das equações definidas por Vazoller (1996), 1) $IVS = PVS/PV \times (100)$ em que: IVS = índice viscerossomático (%); PVS = peso da víscera (g); PV = peso vivo (g); 2) $IHS = PF/PV \times (100)$ em que: IHS = índice hepatossomático; PF = peso do fígado (g); PV = peso vivo (g); e 3) $IGV = PGV/PV \times (100)$ em que: IGV = índice de gordura visceral (%); PGV = peso da gordura visceral (g); PV = peso vivo (g).

2.7 Efetividade da reversão sexual dos peixes

Ao final do período de reversão sexual, foram retirados aleatoriamente dez peixes de cada unidade experimental e, em seguida, foram realizados os exames de análises de machos e fêmeas utilizando método de retirada das gônadas e visualização microscópica utilizando uma adaptação do método de esfregaço das gônadas proposto por Guerrero e Shelton (1974) e validadas por Wassermann e Afonso (2002).

2.8 Composição centesimal da carcaça eviscerada dos peixes

Para a realização das análises bromatológicas, utilizou-se as carcaças de dez peixes de cada unidade experimental. Este material foi pré-secado em estufa de circulação de ar forçado a $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ e posteriormente, foram secos em estufas a 105°C , moídos e preparados para a determinação de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral de acordo com Silva e Queiroz (2002) e AOAC (1990).

2.9 Composição de macro e micronutrientes dos peixes

As amostras para análises de macro e micronutrientes das carcaças dos peixes eviscerados foram enviadas para o Laboratório de Química Agrícola e Ambiental da Unioeste *Campus* de Marechal Cândido Rondon em que se realizou digestão nitro-perclórica conforme (AOAC, 1990) para posterior determinação das concentrações de nitrogênio (N), zinco (Zn), chumbo (Pb) e cromo (Cr), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) por técnicas de espectrometria de absorção atômica modalidade chama (Welz, 1985).

2.10 Análise microbiológica intestinal dos peixes

As análises microbiológicas foram realizadas na PUCPR, *Campus* de Toledo. Foi coletado aleatoriamente ao final da fase de reversão sexual e do experimento, um grama de intestinos de cada unidade experimental, com intuito de quantificar o número de coliformes totais, bactérias totais e colonização pelos probióticos, conforme metodologia descrita por Koneman et al. (2001).

Os intestinos retirados assepticamente foram pesados e diluídos em 1 mL de água destilada estéril por grama de intestino em tubo de ensaio, sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Realizaram-se diluições decimais em tubos com água destilada estéril (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) do material homogeneizado. Utilizou-se para contagem de bactérias totais e coliformes totais, o meio em ágar padrão de contagem (PCA) e ágar Mc Conkey (MAC) em placas de Petri, respectivamente, e adicionado 1 mL das soluções de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

O meio seletivo ágar diferenciador de *Bacillus* foi utilizado em placas de Petri com 1 mL das soluções diluídas em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para verificação da presença de *Bacillus subtilis* C-3102 e *Bacillus cereus* var. *Toyoi*. As placas de Petri devidamente preparadas foram incubadas em estufa microbiológica a 28°C durante 24 horas. As colônias de bactérias foram quantificadas com auxílio do contador de colônias eletrônico da marca Phoenix CP 600 Plus Eletrônico. A contagem inicial de bactérias totais e coliformes totais no intestino dos peixes analisados foi de 49×10^4 e 32×10^4 , respectivamente.

2.11 Análise estatística

Os dados de desempenho produtivo, índices corpóreos, composição centesimal, macros micronutrientes, microbiológicas e custos operacionais parciais ao final da fase de alevinagem foram verificados os pressupostos de normalidade e homogeneidade a 5% dos resíduos, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Em seguida, submetidos à ANOVA, com 5% de significância e, em caso de diferença significativa entre pelo menos um dos tratamentos as médias foram comparadas por Tukey a 5% (Rodrigues, 2002), utilizando o software *STATISTICA*® 7.0. Conforme o modelo estatístico: $Y_{jk} = \mu + \alpha_j + \varepsilon_{jk}$; No qual: Y_{jk} = Espécie de probiótico j e repetição k (j = 1, 2; k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8); μ : Média populacional; α_j : Efeito do probiótico j; ε_j : Erro residual;

Os dados de proporção sexual foram submetidos ao Qui-quadrado (χ^2) utilizando o software computacional livre *Biostat* 5.0 (Ayres et al., 2007).

2.12 Aprovação no comitê de ética

Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná com número de protocolo 80/09.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Monitoramento e qualidade de água – Fase de reversão sexual

Durante o período experimental constatou-se na água de cultivo, os valores médios $\pm$ desvio padrão de $5,86 \pm 1,58$ mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido, $36,70 \pm 0,19$ μ S cm⁻¹ de condutividade, $74,98 \pm 1,00\%$ de saturação de oxigênio dissolvido e $7,4 \pm 0,21$ de pH (Figura 1). Obtiveram valores mínimos de 6,9; $0,14$ μ S cm⁻¹ para pH e condutividade, respectivamente. Estes valores estão em conformidade para o cultivo de tilápia do Nilo segundo Boyd e Tucker (1998).

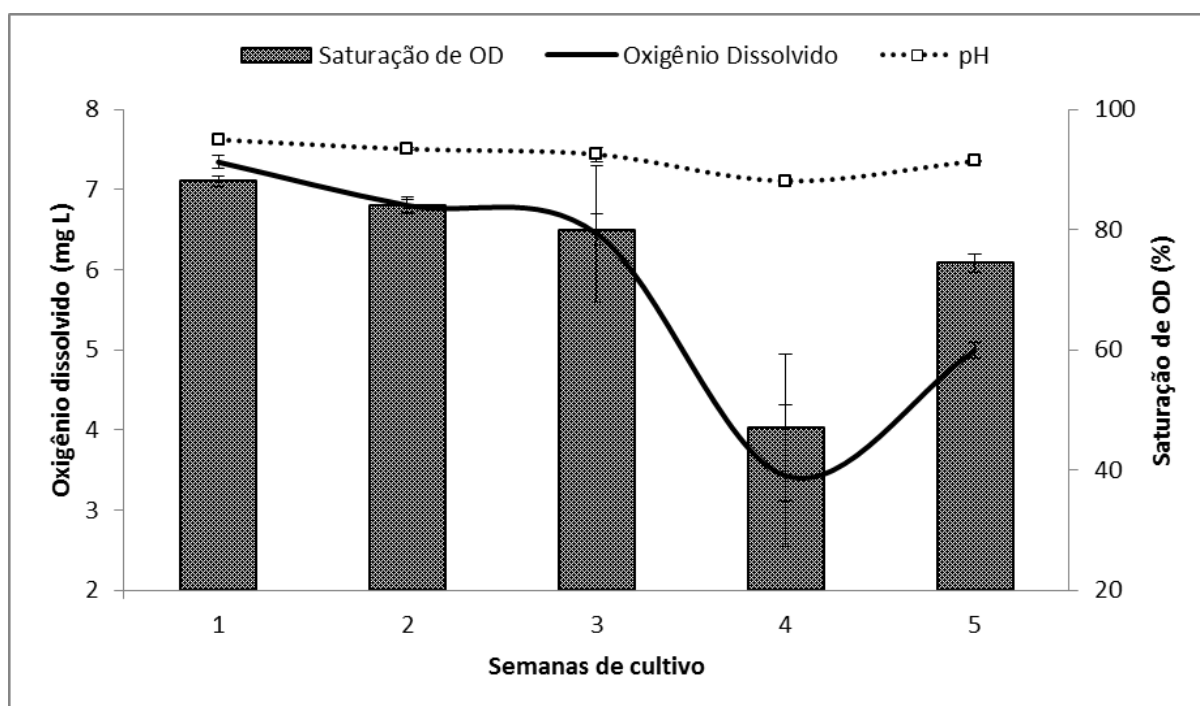


Figura 1. Oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), saturação de OD (%) e pH da água de cultivo durante a fase de reversão sexual de alevinos de tilápia do Nilo.

Verificaram-se durante o período experimental oscilações na variável temperatura, no qual apresentaram valores mínimos pela manhã de 22°C e máximo de 26°C, durante o período da tarde, a média foi de 24,23°C para fase de reversão sexual. Em sistemas de recirculação El-Sayed e Kawanna (2008) demonstraram que a temperatura ótima de conforto para tilápia é 28°C. Os valores de temperatura estavam abaixo do recomendado, porém, não

houve diferença desta variável entre os peixes alimentados com probióticos ou não. O período no qual se realizou o experimento foi caracterizado como inverno na região do oeste do Paraná, portanto, as temperaturas não recomendadas registradas durante o cultivo. Apesar destas temperaturas não desejáveis para a tilápia do Nilo, conforme relatam Sifa et al. (2002), a temperatura letal para tilápias é variável de 11 e 8,4 °C para a linhagem GIFT.

Entre os meses de março a abril houve um decréscimo significativo nos valores observados da temperatura de cultivo, passando de 26°C para 24°C. Até a segunda quinzena deste mês a temperatura estabilizou-se e, ao final da fase de reversão sexual a temperatura chegou ao mínimo de 22°C. Uma das premissas da utilização de probióticos é que os organismos nos quais estão sendo administrados estes promotores de crescimento sejam submetidos a uma fonte de estresse física, química ou biológica para haver prováveis efeitos benéficos ao hospedeiro. Signor et al. (2010) avaliando os parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com níveis de levedura autolisada e zinco, sob condições de estresse pelo frio, observaram que após o desafio com condições nutricionais adequadas, houve alterações nas células do sistema de defesa dos peixes.

3.2 Monitoramento e qualidade de água – Fase de alevinagem

As médias e desvios padrões para temperatura nos períodos matutino e vespertino foram respectivamente de 22,59±1,35°C e 22,62±1,43°C. Durante o período da manhã foram registradas temperatura mínima e máxima de 19 e 25°C, enquanto que no período da tarde foram de 18,50 e 26°C. Resultados semelhantes para essa variável foram observados por Marques et al. (2003) estudando níveis de arraçoamento diário para tilápia do Nilo cultivados em temperaturas baixas, concluíram que numa temperatura média de 23°C o melhor nível de arraçoamento para esta espécie é de 11,55% do peso vivo.

3.3 Desempenho zootécnico dos peixes – Fase de reversão sexual

Observa-se na Tabela 2 que houve diferenças significativas na fase de reversão sexual ($p<0,05$) nos parâmetros de peso final, ganho em peso, peso médio diário e crescimento específico.

O peso final dos peixes que não continham nenhuma bactéria na formulação foi superior ($p<0,05$) aos alimentados com *Bacillus subtilis*, entretanto, comparando-os com os

peixes que receberam na dieta a bactéria *Bacillus cereus* pode-se observar que não houve diferença entre eles.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de desempenho produtivo observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com diferentes probióticos durante a fase de reversão sexual.

Parâmetros	Bactéria			(F; p) ⁽³⁾
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
Peso final (g)	0,28±0,01a	0,23±0,00b	0,28±0,01a	7,64; 0,00321
Ganho de peso (g)	0,26±0,01a	0,21±0,00b	0,26±0,01a	7,64; 0,00321
GPMD (g/dia) ⁽¹⁾	0,0009±0,00a	0,007±0,00b	0,009±0,00a	7,64; 0,00321
CE (%/dia) ⁽²⁾	8,10±0,13a	7,50±0,07b	8,09±0,14a	8,39; 0,00210
Biomassa final (g)	11,00±0,78	9,75±0,37	11,10±0,52	1,67; 0,21260
Ganho de biomassa (g)	9,77±0,78	8,52±0,37	9,86±0,52	1,67; 0,21260
Consumo de ração (g)	9,28±0,73	8,51±0,74	9,05±0,67	0,31; 0,73835
Conversão alimentar	1,00±0,11	1,00±0,08	0,93±0,08	0,18; 0,83354
Sobrevivência (%)	88±0,02	91±0,02	89±0,01	1,08; 0,35947

⁽¹⁾GPMD: Ganho em peso médio diário; ⁽²⁾CE: Crescimento específico; ⁽³⁾F: Variável do teste, p: valores críticos;

Ao final desta fase, os peixes de todos os tratamentos ganharam em média 0,24 g, o que representa um crescimento específico em média de 8%. Comparativamente com os resultados obtidos por Tachibana et al. (2008) que estudaram a densidade de estocagem durante a fase de reversão sexual observou-se valores de crescimento específico entre 14 e 18%, superior aos encontrados no presente trabalho. No entanto, Lara-Flores et al. (2003) estudando a utilização de duas bactérias e um fungo como promotores de crescimento em tilápia do Nilo, obteve o percentual máximo 6,16% no crescimento específico, sendo ainda inferior aos valores obtidos neste estudo. Provavelmente fatores ambientais como a temperatura da água abaixo do recomendado podem ter influenciado no crescimento dos peixes do referido estudo.

A utilização ou não de probióticos em dietas para pós-larvas para tilápia do Nilo, não influenciaram no consumo de ração, conversão alimentar e sobrevivência ($p>0,05$).

A conversão alimentar dos peixes foi de 0,78; 0,97 e 1,10, respectivamente para os tratamentos que não continha probiótico, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. Provavelmente a reduzida conversão alimentar observada nesta fase de cultivo deve-se a quantidade de fitoplâncton oriunda do cultivo, no qual incrementou o crescimento dos peixes. Diferentemente do que foi reportado por Marengoni et al. (2010) no qual estudando o

desempenho produtivo de tilápias vermelhas da linhagem Saint Peter, alimentadas com rações contendo níveis crescentes de probióticos em cultivo de águas mesohalina, observaram valores superiores variando entre 1,97 e 2,25 do que o presente trabalho.

3.4 Desempenho zootécnico dos peixes – Fase de alevinagem

Ao final da fase de alevinagem, observou-se na Tabela 3, que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nos tratamentos contendo probióticos ou não, para os parâmetros de desempenho peso final, ganho em peso, crescimento específico, biomassa final, ganho em biomassa, crescimento específico e consumo de ração.

Embora os valores de desempenho produtivo não tenham diferenças significativas, pode-se observar na Tabela 3 que as médias de peso individual final dos peixes de todos os tratamentos estão de acordo com Faria et al. (2001) que trabalhando com desempenho produtivo da tilápia do Nilo, linhagem tailandesa, em tanques obtiveram peixes com pesos individuais finais variando entre 7,47 e 10,18 g.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de desempenho produtivo observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com diferentes probióticos durante a fase de alevinagem.

Parâmetros	Bactéria			(F; p)
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
Peso final (g)	8,81±0,48	9,23±0,64	8,74±0,48	0,24; 0,78790
Ganho de peso (g)	8,53±0,48	8,99±0,64	8,46±0,48	0,28; 0,75576
GPMD (g/dia)	0,11±0,01	0,12±0,01	0,11±0,01	0,28; 0,75576
CE (%/dia)	4,58±0,07	4,85±0,10	4,59±0,08	3,02; 0,07060
Biomassa final (g)	163,95±25,96	249,46±21,23	229,80±13,90	4,57; 0,02257
Ganho de biomassa (g)	155,50±25,85	242,25±21,27	221,48±13,78	4,70; 0,02060
Consumo de ração (g)	191,32±23,70	239,85±17,73	242,57±10,52	2,53; 0,10381
Conversão alimentar	1,63±0,41	1,02±0,06	1,11±0,05	1,87; 0,17855
Sobrevivência (%)	76,43±0,08b	94,58±0,01a	93,76±0,02a	5,46; 0,01233

⁽¹⁾GPMD: Ganho em peso médio diário; ⁽²⁾CE: Crescimento específico; ⁽³⁾F: Variável do teste, p: valores críticos;

Podemos atribuir este decréscimo desta taxa provavelmente as baixas temperaturas registradas durante esta última fase de cultivo, fator este, limitante ao crescimento dos peixes e que segundo El-Sayed e Kawana (2008) sugere uma temperatura ótima de 28°C. Moura et al. (2007) avaliando o desempenho e atividade de amilase em tilápias do Nilo ratificou que a

temperatura da água influencia o metabolismo e consequentemente no consumo de ração e desempenho produtivo dos animais.

A sobrevivência dos peixes foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pela adição de qualquer um dos probióticos em relação ao ausente (Tabela 3). Aly et al. (2008) estudando o efeito de probióticos na sobrevivência, crescimento e submetendo tilápias do Nilo a infecção, observaram sobrevivências mínimas de 68,88% e máximas de 84,17%, para os grupos ausentes de probióticos e o probiótico Organic Green[®], respectivamente. Os autores relatam que o gênero *Bacillus* demonstra um ótimo potencial para efeitos imunoestimulantes.

Ao final do período experimental verificou-se na Figura 1, que o peso médio final dos peixes variou entre 7,34 e 9,27 g, respectivamente para dietas que continha *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*.

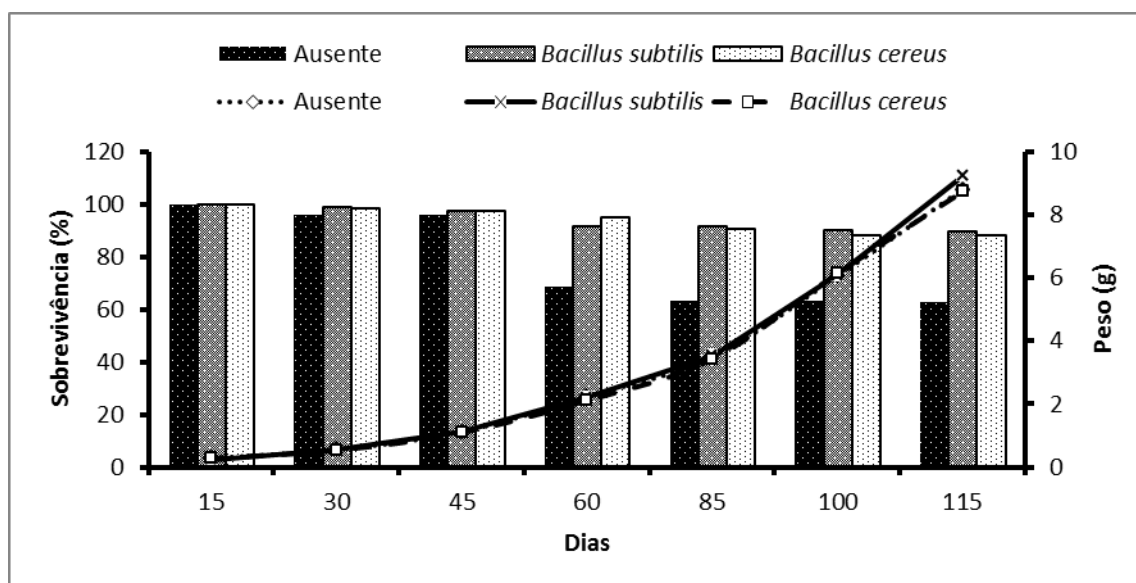


Figura 2. Sobrevivência e peso médio dos alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e ração ausente de probióticos, durante as biometrias quinzenais.

Durante o período de 45 dias de cultivo a sobrevivência dos alevinos em todos os grupos experimentais manteve-se acima de 96%. Os probióticos começaram a atuar na sobrevivência após a quarta biometria, sendo os peixes que não se alimentaram de probióticos obtiveram uma perda de 25,5%. Paralelamente, os peixes alimentados com qualquer um dos probióticos permaneceram com sobrevivências acima de 90%. Quaisquer uns dos probióticos incluídos na formulação da ração atuaram positivamente na sobrevivência até o final do cultivo com taxas superiores de 88% (Figura 1).

3.5 Índices corporais dos peixes

Observa-se na Tabela 4 que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os índices corporais dos peixes dos tratamentos contendo probióticos ou não durante ao final do experimento. Similarmente ao que foi observado por Abd-El-Rhman (2009), que avaliou o efeito da própolis sob a bactéria *Aeromona hydrophila* em alevinos de tilápia do Nilo, também não encontrou diferenças ($p>0,05$) para o índice hepatossomático. Provavelmente, as células do fígado não sofram nenhuma influência da ação de probióticos no organismo dos peixes por conta da baixa concentração na qual foi inclusa o probiótico na alimentação.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão do peso final (PF), comprimento final (CF), índice hepatossomático (IHS), índice viscerossomático (IVS), e gordura visceral (IGV), observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo probióticos.

Bactéria	PF (g)	CF (cm)	IHS (%)	IVS (%)	IGV (%)
Ausente	9,79±0,45	7,98±0,12	0,20±0,04	1,29±0,09	0,10±0,02
<i>B. subtilis</i>	9,50±0,50	8,04±0,21	0,18±0,02	1,14±0,08	0,19±0,12
<i>B. cereus</i>	9,95±0,76	8,09±0,19	0,19±0,02	1,24±0,06	0,06±0,01
(F; p)	0,15; 0,859	0,09; 0,917	0,18; 0,835	1,09; 0,353	0,82; 0,454

⁽¹⁾F: Variável do teste, p: valores críticos;

Os valores obtidos no presente trabalho variaram entre 0,178 e 0,202; 1,136 e 1,293; 0,055 e 0,185%, respectivamente para, índices hepatossomático, viscerossomático e gordura visceral (Tabela 4).

O peso corporal e o comprimento total dos peixes ao final do período de alevinagem apresentaram comportamento geométrico expresso pelas equações de regressão $Y=0,1078x^{4,1817}$ ($R^2=0,82$), $Y=0,209x^{3,1023}$ ($R^2=0,69$) e $Y=0,1018x^{4,2136}$ ($R^2=0,92$), respectivamente para os peixes das dietas que não continham probiótico, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (Figura 2).

O coeficiente de determinação (R^2) da relação peso e comprimento, no qual representa a proporção da correlação resultante de fatores casuais, variaram entre 0,69 e 0,92, para os peixes que não se alimentaram de probióticos e *Bacillus cereus*. Estes resultados são importantes e podem interferir no desempenho produtivo, no sentido de proporcionar peixes mais uniformes e obter um melhor aproveitamento no momento da comercialização, pois a

interação dos peixes maiores sobre os menores promove uma hierarquia resultando numa variação dos lotes cultivados.

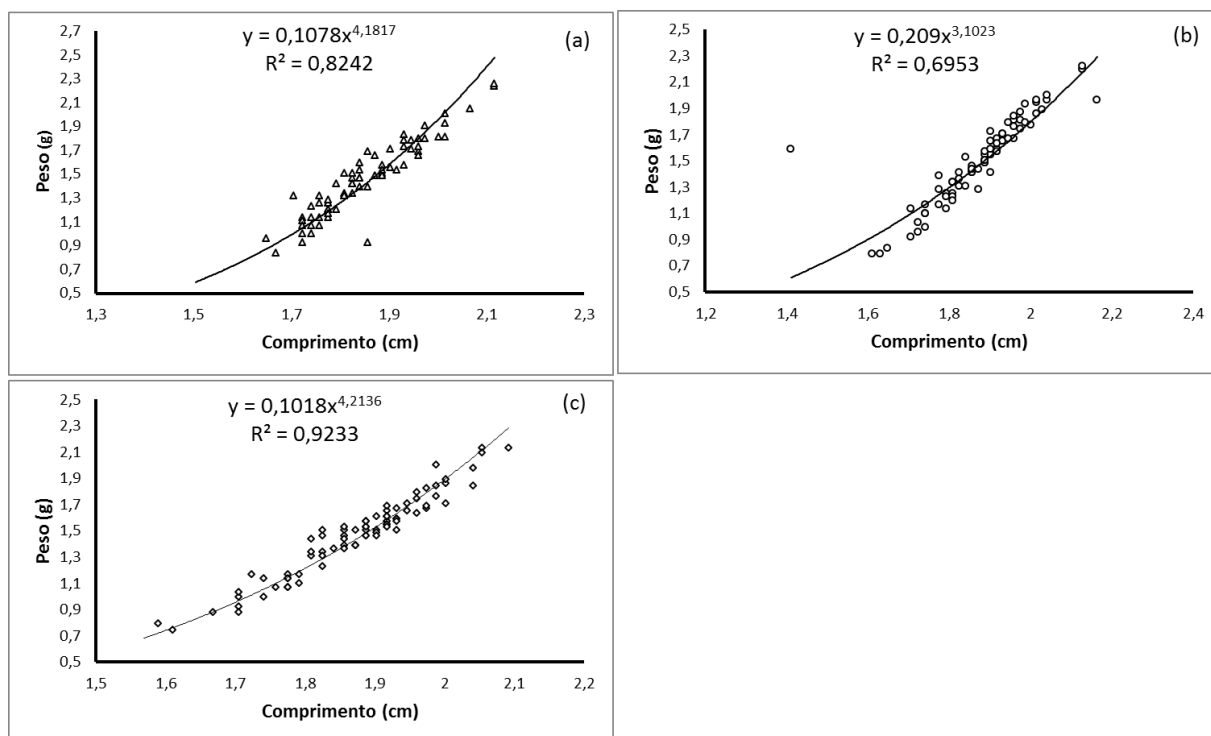


Figura 3. Curvas de regressão para peso (g) e comprimento (cm) de alevinos de tilápia do Nilo não submetidos à probióticos (a), *Bacillus subtilis* (b) e *Bacillus cereus* (c).

Segundo Fox et al. (1997), níveis de cortisol elevados podem induzir alterações na produção do hormônio de crescimento (GnRH), portanto, explicaria a diferença de pesos e tamanhos entre indivíduos do mesmo lote. Portanto, os peixes dominantes tendem a formar zonas de alimentação o que impendem que os subordinados se alimentem e, com isso, aumentando a variação de tamanho dos peixes.

3.6 Efetividade da reversão sexual dos peixes

Foi analisado o sexo fenotípico de 300 peixes, nos quais 262 machos e 38 fêmeas. Na proporção sexual entre macho e fêmeas houve diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) em cada um dos tratamentos ($\chi^2 = 47,57$; $p < 0,0001$; gl = 1 para dieta ausente de probióticos; $\chi^2 = 62,41$; $p < 0,0001$; gl = 1 para dieta contendo *Bacillus subtilis*; $\chi^2 = 53,44$; $p < 0,0001$; gl = 1 para dieta contendo *Bacillus cereus* (Tabela 5).

Na Tabela 5, observou-se que não houve associação entre a proporção entre machos e fêmeas conforme o teste de do Qui-quadrado ($\chi^2 = 1,42$; $p = 0,4926$). Estes resultados diferem daqueles observados por Marengoni et al. (2010) no qual avaliando a proporção sexual de alevinos de tilápia vermelha, linhagem Saint Peter, verificaram que fatores bióticos e abióticos não afetaram na proporção sexual.

Tabela 5. Números de peixes analisados, valores médios e desvio padrão (s) de peso corporal, comprimento total (TL) e fator de condição (Kn), observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com diferentes probióticos.

Parâmetro	Bactéria			s	Média	CV(%)
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>			
Machos	87	90	85	2,52	87,33	2,88
Fêmeas	16	10	12	3,06	12,67	24,12
(%)	84,47	90,00	87,63			
χ^2	47,57	62,41	53,44			
p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001			
Peso macho	7,88	8,74	8,80	0,51	8,47	6,06
TL macho	7,37	7,75	7,64	0,20	7,59	2,60
Peso fêmea	6,15	7,67	7,49	0,83	7,10	11,71
TL fêmea	6,79	7,36	7,42	0,34	7,19	4,79
Kn macho	1,82	1,79	1,79	0,02	1,80	0,99
Kn fêmea	1,84	1,76	1,74	0,05	1,78	2,81
χ^2 (associação) ⁽¹⁾	1,42					
p ⁽²⁾	0,4926					

⁽¹⁾ χ^2 : Variável do teste, ⁽²⁾p: valores críticos;

No entanto, no presente trabalho fez-se a reversão sexual utilizando o hormônio andrógeno sintético masculinizante 17- α -metiltestosterona e com isso, esperava-se uma porcentagem acima de 95%, porém observou-se aproximadamente 87,33% de machos após a reversão sexual. Atribui-se a este resultado inferior ao que é recomendado em cultivos comerciais provavelmente às temperaturas abaixo do recomendado para um ótimo crescimento da espécie.

3.7 Composição centesimal da carcaça eviscerada dos peixes

Na Tabela 6, estão expressos os valores médios e desvio padrão de composição centesimal dos alevinos de tilápia do Nilo ao final do experimento. Para as variáveis de proteína bruta, extrato etéreo, umidade e matéria mineral não se observaram diferenças ($p > 0,05$) entre os peixes alimentados com dietas contendo ou não probióticos.

Estes parâmetros são importantes, pois fornece informações para a determinação de níveis adequados para que se possa substituir algum ingrediente em função da sua formulação.

Os resultados encontrados neste trabalho foram inferiores aos observados por Hisano et al. (2007) alimentando alevinos de tilápia do Nilo com leveduras íntegra, autolisada e parede celular, e que também não constatarem diferenças na composição centesimal dos alevinos.

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão da composição centesimal (%) na matéria seca da carcaça de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes probióticos.

Nutriente (%)	Bactéria			(F; p) ⁽¹⁾
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
Proteína Bruta	15,41±0,35	15,80±1,90	15,09±0,37	0,10; 0,90696
Extrato Etéreo	8,77±0,25	8,32±0,80	7,43±0,87	0,95; 0,40216
Umidade	76,97±0,29	75,58±2,20	75,60±0,59	0,36; 0,69988
Matéria Mineral	3,94±0,59	4,55±0,38	4,48±0,11	0,67; 0,52476

⁽¹⁾F: Variável do teste, p: valores críticos

El-Haroun et al. (2006) utilizando o probiótico Biogen[®] em dietas para promover o crescimento de tilápias do Nilo, observaram para os parâmetros de umidade, proteína bruta, lipídeos e cinzas valores médios mínimos e máximos de 71,13 e 75,49; 13,50 e 15,33; 4,22 e 8,29; 5,26 e 6,73, respectivamente.

Estas diferenças devem-se a formulação utilizada no presente experimento que se utilizou de uma dieta isoprotéica e isocalórica, contendo 38% de PB e 3272 kcal kg⁻¹. Ogawa (1999) relatou que o músculo do pescado pode conter entre 60 e 85% de umidade, 20% de proteína em média, 1 a 2% de cinzas, 0,3 a 1% de carboidrato e de 0,6 a 36% de lipídeos.

3.8 Composição de macro e micronutrientes dos peixes

Na Tabela 7, pode-se observar que não houve efeito ($p>0,05$) da inclusão de probióticos sobre a carcaça de alevinos de tilápia nos macronutrientes Nitrogênio (N), Potássio (K) e Magnésio (Mg). A inclusão de quaisquer dos probióticos influenciou ($p<0,05$) nos teores de Ca na carcaça de alevinos de tilápia do Nilo em relação aos peixes ausentes de probióticos.

A adição de probióticos na ração ($p>0,05$) não afetou os micronutrientes essenciais cobre, ferro, manganês e zinco e, os tóxicos cádmio, chumbo e cromo (Tabela 7).

Os teores de Cu da carcaça dos peixes eviscerados variaram entre 6,63 e 9,00 mg/kg, respectivamente, para *Bacillus cereus* e ausente de probióticos e, estão dentro do limite máximo permitido da legislação brasileira que é de 30 mg/kg (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de macronutrientes (g/kg) e micronutrientes (mg/kg) da carcaça de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes probióticos.

Macronutriente	Bactéria			(F; p) ⁽¹⁾
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
Nitrogênio (N)	96,48±2,34	95,74±3,75	96,76±2,53	0,03; 0,96851
Potássio (K)	7,66±0,13	7,40±0,11	7,56±0,15	0,98; 0,39367
Cálcio (Ca)	53,31±1,68b	62,93±2,14a	60,76±1,85a	7,04; 0,00458
Magnésio (Mg)	2,69±0,10	2,66±0,15	2,72±0,17	0,04; 0,96114
Micronutriente				
Cobre (Cu)	9,00±1,63	8,75±1,58	6,63±0,57	0,94; 0,40759
Ferro (Fe)	62,75±2,58	58,38±6,46	67,25±4,40	0,87; 0,43298
Manganês (Mn)	8,88±2,24	7,00±1,12	6,88±0,72	0,56; 0,58210
Zinco (Zn)	107,13±2,22	112,13±1,79	112,38±2,49	1,84; 0,18309
Cádmio (Cd)	1,00	1,00	1,00	-
Chumbo (Pb)	6,25±0,88	8,38±1,10	6,63±0,75	1,51; 0,24421
Cromo (Cr)	13,00±0,66	13,63±0,65	13,50±0,57	0,28; 0,75935

⁽¹⁾F: Variável do teste, p: valores críticos

A legislação brasileira não delimita valores máximos dos metais pesados essenciais Fe e Mn em alimentos. Porém, os resultados para estes dois micronutrientes foram menores pelos observados por Marengoni et al. (2008) que estudando o desempenho produtivo de linhagens de tilápias mencionaram concentrações máximas de 1.101,50 e 12,50 mg/kg e 445,00 e 5,25 mg/kg para a linhagem GIFT e Chitralada, respectivamente para Fe e Mn.

As amostras das carcaças evisceradas ao final do cultivo apresentaram dobro de concentração recomendada do metal Zn em alimentos prevista pela regulamentação que é de 50 mg/kg (Tabela 7). Estes resultados são similares aos expressos por Souza et al. (2009) que estudando metais pesados em diversas espécies de um pesqueiro encontraram uma variação entre 19,6 e 145,7 mg/kg para este metal.

Pode-se observar na Tabela 7, que a concentração média de Cd para todos os peixes dos grupos submetidos ou não a probióticos na alimentação foi de 10,00 mg/kg, ou seja, o limite máximo estabelecido pela legislação para este metal em alimentos (Brasil, 1965).

Os metais pesados tóxicos ultrapassaram os valores permitidos delimitados pela legislação, sendo verificados teores máximos para *Bacillus subtilis* (8,38 e 13,63 mg/kg) e para os peixes que não continham probióticos na formulação (6,25 e 13,00 mg/kg), respectivamente para Pb e Cr (2,00 e 0,1 mg/kg). Resultados similares ao referido trabalho para o metal cromo também foram obtidos por Espinoza-Quiñones et al. (2010) que estudando elementos traços em músculos, brânquias e gônadas de peixes do Rio São Francisco do Paraná, obtiveram valores de 0,15 mg/kg, ou seja, superior permitido pela ANVISA (Brasil, 1965).

Apesar da maioria dos metais pesados do estudo em questão estarem acima do recomendado pela legislação em vigor, estas informações são de extrema importância na avaliação da qualidade dos alimentos produzidos, controle ambiental, no sentido de avaliar a bioacumulação da fauna, flora e qualidade da água e, portanto, minimizarmos os prováveis impactos gerados da ação antrópica sobre o meio ambiente.

3.9 Análise microbiológica intestinal dos peixes

Os probióticos influenciaram ($p < 0,05$) na contagem de bactérias totais e coliformes totais ($p < 0,05$) entre as fases de cultivo, sendo inferior na reversão sexual em relação à alevinagem.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão de bactérias totais, coliformes totais e presença/ausência de *Bacillus* dos intestinos de alevinos de tilápias do Nilo alimentadas com diferentes probióticos durante os períodos de reversão sexual e alevinagem.

Contagem bacteriana (log UFC mL ⁻¹)			
	Bactérias totais	Coliformes totais	<i>Bacillus</i>
	Média	Média	+/- ⁽²⁾
Fase de cultivo	⁽¹⁾ F=12,59; p=0,00097	F=18,83; p=0,00009	
Reversão	4,59±0,10b	3,05±0,06b	+
Alevinagem	5,97±0,39a	4,66±0,36a	+
Bactéria	F=1,23; p=0,30304	F=0,05; p=0,94724	
Ausente	4,85±0,53	3,79±0,48	+
<i>Bacillus subtilis</i>	5,54±0,29	3,93±0,31	+
<i>Bacillus cereus</i>	5,44±0,28	3,84±0,33	+
Bactéria	Fase de cultivo	F=2,48; p=0,09607	F=1,54; p=0,22666

⁽¹⁾F: Variável do teste, p: valores críticos; ⁽²⁾ + Presença / - Ausência

Jatobá et al. (2008) estudando o isolamento de bactéria ácido lácticas do intestino de tilápias do Nilo como objetivo de avaliar potenciais probióticos, observaram valores de bactérias totais diferentes aos encontrando no presente trabalho nos quais variaram entre 6,35 e 8,06 log UFC mL⁻¹.

Provavelmente o tempo de utilização de probióticos tenha influenciado na contagem de bactérias totais durante o cultivo. Além disso, os probióticos utilizados *in vivo* foram isolados do intestino da mesma população de peixes em que seriam submetidos posteriormente ao um desafio, diferentemente ao que foi realizado neste estudo. E conjuntamente a esta hipótese, estes valores podem ter sido diferentes devido ao mecanismo de inibição por exclusão competitiva por nutrientes, espaço ou especificidade da relação probiótico-hospedeiro, conforme relata Gomez-Gil et al. (2000).

A contagem de log UFC mL⁻¹ de bactérias totais variou entre 4,85 para os peixes ausentes de probiótico na formulação e 5,539 para *Bacillus cereus* (Tabela 8), não sendo observados efeitos sobre este parâmetro ($p > 0,05$).

A contagem de coliformes totais não foi influenciada ($p < 0,05$) pela a adição de probióticos nas rações e interação (fase de cultivo e bactéria) para alevinos de tilápia do Nilo durante as fases de reversão sexual e alevinagem (Tabela 9).

Foi observada a presença de *Bacillus* em todos os tratamentos. Considerando que *Bacillus* são bactérias gram positivas, cosmopolitas que podem ser isoladas de vários habitats como água, solo e ar, então, possivelmente os peixes que não se alimentaram de probióticos podem ter tido contato por outra via de transmissão, como por exemplo, em algum ingrediente da ração que continha o gênero *Bacillus*, manipulação externa ou até mesmo a água na qual os peixes foram cultivados.

4 CONCLUSÕES

1. Considerando que a efetividade durante a reversão sexual não foi alterada negativamente e obteve-se um melhor desempenho produtivo, recomenda-se o probiótico contendo *Bacillus cereus* C-3102.
2. A utilização de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus* beneficia a sobrevivências de tilápia do Nilo ao final do cultivo de alevinagem.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, S.M.; MOHAMED, M.F.; JOHN, G. Effects of probiotics on the survival, growth and challenge infection in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.*, v.39, p.647-656, 2008.

ABD-EL-RHMAN, A.M.M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immu.*, v.27, p.454-459, 2009.

AOAC. *Association of Official Analytical Chemists*. Official methods of analysis. 15th ed. Washington, D.C, 1990.

AYRES, M.; AYRES, M.JR.; AYRES, D.L. et al. *Biostat. Versão 5.0*, Sociedade civil Mamirauá; MCT-CNPq, Belém, Pará, Brasil, 2007.

BÁLCAZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I. et al. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, v.114, p.173-186, 2006.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. *Pond aquaculture water quality management*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. 700p.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Decreto nº 55871 de março 1965. Modifica o decreto nº 50040, de 24 janeiro 1961 referente a normas regulamentadoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março 1962. *Diario Oficial*. Brasília, 9 abril 1965. Seq. 1, pt.1, p.3611.

CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.*, v.xx, p.1-7, 2010.

CYRINO, J.E.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y. et al. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.39, p.68-87, 2010.

EL-HAROON, E.R.; GODA, A.M.A-S; CHOWDHURY, M.A.K. Effect of dietary probiótico Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), *Aquac. Res.*, v.37, p.1473-1480, 2006.

EL-SAYED, A.F.M.; KAWANNA, M. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquac. Res.*, v.39, p.670-672, 2008.

ESPINOZA-QUIÑONES, F.R.; MÓDENES, A.N.; PALÁCIO, S.M. et al. Evaluation of trace element levels in muscles, liver and gonad of fish species from São Francisco River of the Paraná Brazilian state by using SR-TXRF technique. *Appl. Radiat. Isot.*, v.68, p.2202-2207, 2010.

FARIAS, A.C.E.A.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E.M. et al. Farinha de peixe em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem tailandesa. *Acta Sci. Anim. Sci.*, v.3, p.903-908, 2001.

FARZANFAR A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol.Med. Microbiol.*, v.48, p.149-158, 2006.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization, 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm>. Acessado em 07 fev. 2002.

FOX, H.; WHITE, S.A.; KAO, M.H.F. et al. Stress and dominance in a social fish. *J. Neurosci.*, v.17, n.16, p.6463-6469, 1997.

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

GUERRERO, R.D.; SHELTON, W.L. An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *Prog. Fish. Cult.*, v.56. 1974.

HISANO, H.; NARVÁEZ-SOLARTE, W.V.; BARROS, M.M. et al. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com levedura e derivados. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.42, p.1035-1042, 2007.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE NETO, C. et al. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesq. Agropecu. Bras.*, v.43, n.9, p.1201-1207, 2008.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J. et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, v.274, p.1-14, 2008.

KONEMAN

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B.E. et al. 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, p.193-201, 2003.

MARENGONI, N.G.; ALBUQUERQUE, D.M.; MOTA, F.L.S. et al. Desempenho produtivo de tilápia vermelha submetida à dieta contendo probiótico durante a alevinagem em água mesohalina. *Arch. Zootec.*, v.59, p.403-414, 2010.

MARENGONI, N. G.; POSSAMAI, M.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C. et al. Performance e retenção de metais pesados em três linhagens de juvenis de tilápia-do-Nilo em hapas. *Acta Sci. Anim. Sci.*, v. 30, n. 3, p. 351-358, 2008.

MARQUES, N.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. et al. Níveis diários de arraçoamento para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*, L.) cultivados em baixas temperaturas. *Semina*, v.24, p.97-104, 2003.

MOURA, G.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, E.T.A. et al. Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.42, p.1609-1615, 2007.

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

OGAWA, M. Química do pescado. In: OGAWA, M. e MAIA, E. L. *Manual de pesca*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. p.29-72.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootecn.*, v.31, p.1595-1604, 2002.

RODRIGUES, P. C. *Bioestatística*. Niterói: EdUFF, 2002. 339p.

SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.42, p.1-16, 2006.

SIFA, L.; CHENHONG, L.; DEY, M. et al. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. *Aquaculture*, p.123-129, 2002.

SIGNOR, A.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R. et al. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. *Ci. Anim. Bras.*, v.11, p.509-519, 2010.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SOUZA, G.R.; GARCEZ, M.A.P.; SANTOS, V.C.G. et al. Quantificação de metais pesados em peixes de um pesqueiro localizado na cidade de Umuarama. *Arq. Cienc. Vet. Zool. Unipar*, v.12, n.1, p. 61-66, 2009.

TACHIBANA, L.; LEONADO, A.F.G.; CORRÊA, C.F. et al. Densidade de estocagem de pós-larvas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. *Bol. Inst. Pesca*, v.34, n.4, p.483-488, 2008.

TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L. et al. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.*, v.96, p.219-233, 2004.

VAZOLLER, A.E.A.M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 1996. 169p.

WASSERMANN, G.J.; AFONSO, L.O.B. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Cienc. Rural*, v.32, p.133-139, 2002.

WEATHERLEY, A.H. *Growth and Ecology of fish population*. Londres: Academic Press, 1972. 293p.

WELZ, B. *Atomic absorption spectrometry*. Weinheim: 2.ed., Weinheim, VHC, 1985 506p.

WILLIAM, L.D.; BURDOCK, G.A.; JIMÉNEZ, G. et al. Literature review on the safety of Toyocerin[®], a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *Toyoi* preparation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.55, p.236-246, 2009.