

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

VALDIR SILVA DE CASTRO

Probióticos do gênero *Bacillus* em dietas para pós-larvas de tilápia do
Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Toledo - PR
2020

VALDIR SILVA DE CASTRO

Probióticos do gênero *Bacillus* em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, 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. Dr. Arcangelo Augusto Signor

Toledo - PR

2020

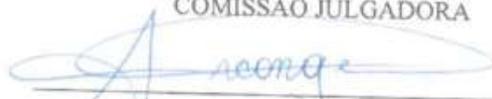
FOLHA DE APROVAÇÃO

VALDIR SILVA DE CASTRO

Probióticos do gênero *Bacillus* em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, 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.

COMISSÃO JULGADORA



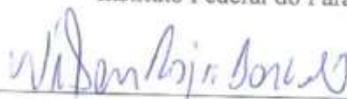
Prof. Dr. Arcangelo Augusto Signor

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof. Dr. Anderson Coldebella

Instituto Federal do Paraná



Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 04/05/2020

Local de defesa: Toledo.

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Castro, Valdir Silva de
Probióticos do gênero Bacillus em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Valdir Silva de Castro; orientador(a), Arcangelo Augusto Signor, 2020.
32 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2020.

1. Aquicultura. 2. Nutrição. 3. Probióticos. 4. Alimento alternativo. I. Signor, Arcangelo Augusto. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Antonio de Castro, Maria Perpetua silva de Castro aos meus irmãos Antonio Bernardo Silva de castro, Antonio João Silva de Castro, Adilson Silva de Castro, José de Maria silva de Castro e familiares por sempre me apoiarem em minhas escolhas e decisões o meu muito obrigado a todos.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço primeiramente a Deus meu pai Oxalá, por me dar forças nesta jornada.

Agradeço a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realiza este trabalho, ao meu orientador pela paciência e orientação professor Dr. Arcangelo Augusto Signor, aos professores, Dr. Altevir Signor e Dr. Wilson Rogério Boscolo por repassar seus conhecimentos que para mim foram de grande valia.

Agradeço ao Grupo de Estudos em Manejo na Aquicultura – GEMaQ e todos os seus membros.

Aos secretários do programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – PREP Nível de Mestrado e Doutorado do centro de Engenharias e ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

Agradeço a Rosana, Antonio Francisco, Mikaele, Karla, Raiana, José Rafael, Débora entre outros por sempre está apoiando e colaborando deste o início a todos o meu muito obrigado.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Histologia dos fígados de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados diferentes níveis de probióticos25
- Figura 2. Corte histológico à 5 μ do fígado de pós-larva tilápia do Nilo, demonstrando como foi realizado as medidas perímetro, área e volume do núcleo do hepatócito.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação das dietas utilizadas no experimento de desempenho produtivo de pós-larvas de tilápia do Nilo.	19
Tabela 2. Parâmetros de desempenho produtivo de pós-larvas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados diferentes níveis de probióticos.....	23
Tabela 3. Composição centesimal de pós-larvas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados diferentes níveis de probióticos	24
Tabela 4. Histologia dos intestinos de pós-larvas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados diferentes níveis de probióticos.	25
Tabela 5. Histologia dos fígados de pós-larvas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados diferentes níveis de probióticos	27

SUMÁRIO

CAPITULO I.....	10
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2. REFERÊNCIAS	13
CAPITULO II	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
Probiótico utilizado	19
Elaboraões das dietas.....	19
Adaptação ao sistema de cultivo experimental	21
Parâmetros físico-químico da água	21
Análises laboratórios realizadas	21
Desempenho produtivo.....	22
fígado e intestino	22
Análises bromatológicas.....	22
Análises estatísticas	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	29

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A aquicultura tem uma longa história, seus primeiros relatos possuem mais de 2000 anos na China. A intensificação dos sistemas de produção por sua vez repercutiu globalmente no comércio de frutos do mar com notáveis desenvolvimentos na indústria da aquicultura, contribuindo significativamente para segurança alimentar (BOYD e TUCKER, 1998; WANG et al., 2008; HOSEINIFAR et al., 2017).

Há poucas décadas, a forma tradicional da produção da aquicultura era realizada de forma extensiva, sem oferta de alimentação, somente através da produtividade primária que proporcionava baixa densidade por metro quadrado (m²), e com pouca eficiência de produção (CAVALHEIRO et al., 2014). Takahashi (2018) descreve sobre a recente evolução de técnicas que alavancaram os cultivos, de modo convencional para cultivos mais intensivos, tendo um fator de maior viabilidade economia para a piscicultura.

No Brasil a tilápia é a espécie indicada para cultivos intensivos, por possui características peculiares, como rusticidade a elevados fatores de estresse, adaptando-se bem às condições de produção (MARENGONI et al., 2015). De acordo com Falcon et al. (2008), essas condições prolongadas e desencadeadas de estresses crônicos em organismos aquáticos, a nutrição e manejos está sendo a melhor forma de assumir papéis fundamentais nos cultivos da espécie.

Na fase de larvicultura deve haver uma maior observação para que se obtenham animais de boa qualidade, desta forma a nutrição é um fator que exerce grande importância, sendo pré-requisito para as fases posteriores de cultivo (HAYASHI et al., 2002). Neste sentido, as pesquisas estão sendo realizadas com intuito de obter maiores informações sobre formulação de ração que atendam às exigências requeridas pelas espécies de peixes cultiváveis, equilibrando alimentos protéicos e energéticos nas rações comerciais, porém existem entraves nestas dietas que apresentam altos custos (PEZZATO et al., 2009).

O cultivo intensivo com a melhoria das técnicas sustentáveis modernas contribui para reduzir a pressão sobre os estoques naturais, aumentando o abastecimento de pescado de boa qualidade nutricional e protéica para o consumo humano, bem como aumentar a

confiabilidade do consumidor por sua vez mais exigente (IBRAHEM 2013, DE MELO LIMA et al., 2018). A intensificação ao longo de algumas décadas no setor aquícola vem sofrendo inúmeras mudanças para atender ao crescente consumo de pescado, as produções estão cada vez mais intensivas e com sucessivo uso de dietas balanceadas que atendam a exigência dos animais cada vez mais específica, com aplicações de aditivos que promovam elevado crescimento (NAYAK, 2010). O uso de probióticos e o manejo de doenças na aquicultura, com referência especial na piscicultura tem sido discutido e revisado por (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Suplementações alimentares à base de probióticos podem ser consideradas como sendo um conjunto de seres vivos que tem a capacidade de colonizar e multiplicar-se no intestino dos animais, equilibrando a microbiota e melhorando a absorção de nutrientes nos hospedeiros (FULLER, 1989; MELLO et al., 2013). Probiótico é um promotor que confere ações benéficas para os peixes com diferentes modos de ação ao hospedeiro. Na aquicultura tem sido considerada como uma boa estratégia sustentável, pois controla patógenos que provocam doenças, mas também na nutrição, crescimento e saúde (LAZADO E CAIPANG, 2014; BATISTA et al., 2016). A ocorrência de stress é verificada por meio de manejo a ser aplicada na piscicultura, representada por maior evidencia na manipulação excessiva de transporte de peixes na intensificação que favorecem ao meio de cultivo uma condição que enfraquece o sistema imunitário que conduz a uma maior susceptibilidade a doenças e patógenos (SADO-YUJI et al., 2014; DAWOOD et al., 2016; DE MELO LIMA et al., 2018).

Li et al. (2019) relatam sobre peixes que estão em contato direto no ambiente aquático que possuem concentrações elevadas de bactérias e vírus, em sua maioria são saprófagos e alguns patógenos. Descreve que o surgimento de doenças é principalmente devido ao desequilíbrio de condições ambientais composta por patógeno, hospedeiro considerado um problema emergente limitando o crescimento da atividade, uma vez que implica grandes mortalidades e conseqüentemente, perdas de cunho econômico (DOS SANTOS JÚNIOR et al., 2016; DE MELO LIMA et al., 2018).

No mercado podem-se encontrar comercialmente vários tipos de probióticos na forma de emulsões líquidas, liofilizadas, liofilizadas-protégidas por microencapsulados, essas bactérias probióticas podem suportar elevadas temperaturas no processamento de ração entre 130-150°C extrusão, com pressão entorno de 30 a 60 atm (VIEIRA et al., 2005). Conforme Nakandakare et al., (2013) a inclusão de bactérias probióticas na dieta de peixes pode ser realizada misturando-se, tanto, o pó probiótico liofilizado na ração na

forma farelada/triturada para alimentar larvas e pós-larvas, como também misturada antes ou depois da peletização, em que não haja temperaturas superiores a 60°C, no processamento de rações com probióticos liofilizadas não protegidas.

O uso de probióticos em rações para a suinocultura, avicultura e piscicultura existe há várias décadas e as pesquisas demonstram várias respostas positivas com a oferta deste aditivo como fonte dietética (CAVALHEIRO et al., 2014).

No intestino de animais podem ocorrer desequilíbrios de aspectos químicos e físicos sendo considerados como mecanismos antibacterianos, que devem ser avaliados para que o desenvolvimento dessas bactérias benéficas possa colonizar e realizar maior eficiência na absorção dos alimentos (FULLER, 1989; MARENGONI et al., 2015).

Linh et al. (2018) avaliaram em seu estudo as propriedades probióticas de *Lactobacillus lactis* para aplicação em aquacultura a partir de vegetais fermentados e com a investigação descobriram a sua eficácia contra as bactérias Gram-positivas e bactérias patogênicas Gram-negativas. A flora microbiana a base de probióticos que colonizam o intestino de peixes desempenha um papel importante para a colonização do intestino por agentes patogênicos (MANZANO et al., 2012).

Os primeiros probióticos encontrados foram às bactérias *Lactobacillus. sp.*, que produzem ácido láctico e possuem grande aplicação em suplementação animal (SAHU et al., 2008). O gênero *Bacillus*, tem sido utilizado como fonte de incorporação em dietas, por ter boas características, como resistência ao calor e pressão. Suas enzimas possuem grande eficiência em degradação de carboidratos, lipídios e proteínas, gerando maior disponibilidade para absorção no intestino dos organismos aquáticos (OCHOA-SOLANO et al., 2006).

De acordo com Ferreira et al. (2015) e Doroteo (2018) o uso dessa microflora denominado probióticos, na forma de profilaxia, tem demonstrado grande viabilidade econômica em cultivos, com o intuito de substituir agentes nocivos antibióticos que são aplicados em elevadas concentrações discriminadamente na aquicultura.

Entre as várias definições os estudos têm uma linha de raciocínio muito próximo assim, todos eles têm um ponto em comum, na afirmação de que os probióticos são organismos vivos que são administrados por via oral e traz benefícios para a saúde do animal de interesse (DOS SANTOS JÚNIOR et al., 2016; NEWAJ-FYZUL et al., 2014; IBRAHEM, 2013; IRIBARREN et al., 2012; NAYAK, 2010; DE MELO LIMA et al., 2018).

O controle de agentes patogênicos que afeta diretamente o setor aquícola, vem demonstrando ser bem eficiente com o uso de microbiotas benéfica. Estudos demonstram que esses microrganismos possuem grande potencial, de forma a encaminhar uma aquicultura sustentável e ecológica (CORNÉLIO et al.,2013; LAZADO et al.,2014).

2. REFERÊNCIAS

BATISTA, S; MEDINA,A; PIRES, M.A; MORINIGO,M.A; SANSUWAN,K; FERNANDES, J.M.O; VALENTE,L.M.P; OZÓRIO,R.O.A. Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7223-7238, 2016.

Boyd, C.E., Tucker, C.S. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer, Norwell, MA, p. 1, 1998.

CAVALHEIRO A.C.M., CASTRO. M.L.S., EINHARDT M.D.S., POUHEY J.L.O.F., PIEDRAS S.N., XAVIER E.G. Microingredientes utilizados em alimentação de peixes em cativeiro–Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, p. 11-20, 2014.

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

DAWOOD, M. A.O; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243-251, 2016.

DE MELO LIMA, V. M, JÚNIOR.A.F.C, SCHEIDT, G.N, SILVA, E.C.S, PORTELA, A.C.F. Probiotics in Aquaculture Review: Current Status and Application in Tambaqui Cultivation (*Colossoma macropomum*). **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 5, n. 5, 2018.

DOROTEO, A. M., PEDROSO, F.L., LOPEZ, J.D.M., APINES-AMAR, M.J.S Evaluation of potential probiotics isolated from saline tilápia in shrimp aquaculture. **Aquaculture international**, p1-13, 2018.

DOS SANTOS JÚNIOR, M. M, JESUS, G.F.A, LEGARDA. E.C, MOURIÑO, J.L.P, SEIFFERT, W.Q, VIEIRA, F.N. Utilização comparativa de enrofloxacino, probiótico (*Lactobacillus plantarum*) e propionato de sódio na larvicultura de camarão branco do pacífico. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 3, 2016.

FALCON, D.R., BARROS, M.M., PEZZATO, L.E.P., SOLARTE, W.V., NARVAEZ, S., GUIMARÃES, I.G. Leucograma da tilápia do Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.543-551, 2008.

FERREIRA, A. H. C; BRITO, J.M; LOPES ,J.B;SANTANA JUNIOR, H. A;; BATISTA,J.M.M; SILVA,B.R; SOUSA, E.M; AMORIM,I.L.S. Probiótico na alimentação de pós-larvas de tilápias-do-nilo submetidas a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 430-439, 2015.

FULLER, AFRC.R. Probiotics in manandanimals. **Journal of applied bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

HAYASHI, C; BOSCOLO, W.R; SOARES, C.M; MEURER,F. Exigência de proteína digestiva para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31. N.2, p. 823-828, 2002.

HOSEINIFAR, S. H; DADAR, M; RINGO, E. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 8, p. 3987-4000, 2017.

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 765-791, 2013.

IRIBARREN, D, DAGA, P, MOREIRA, M.T, FEIJOO, G. Potential environmental effects of probiotics used in aquaculture. **Aquaculture international**, v. 20, n. 4, p. 779-789, 2012.

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

LAZADO, C. C; CAIPANG, C. M. A. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. **Aquaculture**, v. 424, p. 53-62, 2014.

LI, X; RINGO, E; HOSEINIFAR, S.H; LAUZON, H.L; BIRKBECKS, H AND YANG, D. The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 603-618, 2019.

LINH, N. T. H, SAKAI, K, TAOKA, Y. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented food as potential probiotics for aquacultured carp and amberjack. **Fisheries science**, v. 84, n. 1, p. 101-111, 2018.

MANZANO, M; IACUMI.L; GIUSTO, C; CECCHINI, F; PATTHEY, C; FONTANILLAS R. END COMI, G. Utilization of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to evaluate the intestinal microbiota of brown trout *Salmo trutta fario*. **J Vet Sci Med Diagn** 1, v. 2, p. 2, 2012.

MARENGONI, N. G., WEISS, L.A., ALBUQUERQUE, D.M. e MOURA, M.C. Influência de probióticos na prevalência parasitária e níveis de glicose e cortisol em tilápia do Nilo. **Archivos de zootecnia**, v. 64, n. 245, p. 63-69, 2015.

MELO, H., MORAES, J.R.E., NIZA, I.G., MORAES, F.R., OZÓRIO, R.O.A., SHIMADA, M.T., FILHO, J.R.E., CLAUDIANO, G.S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesq. Vet. Bras**, v.33, n.6, p.724-730, 2013.

NAKANDAKARE, I.B., IWASHITA, M.K.P. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, p. 121-135, 2013.

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

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

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A. H.; AUSTIN, B. Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 1-11, 2014.

OCHOA-SOLANO, J.L., OLMOS-SOTO, J. The functional property of Bacillus for shrimp feeds. **Food microbiology**, v. 23, n. 6, p. 519-525, 2006.

PEZZATO, L.E., BARROS, M.M., FURUYA, W.M. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p.43-51, 2009.

SADO-YUJI, R, DE ALMEIDA BICUDO, Á. J, CYRINO, J. E. P. Hematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed graded levels of mannan oligosaccharides (MOS). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 30-39, 2014.

SAHU, M.K., SWARNAKUMAR, N.S., SIVAKUMAR, K., THANGARADJOU, Y., KANNAN, L. L Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian journal of microbiology**, v.48, n.3, p. 299-308, 2008.

Takahashi, N.S (2018). Nutrição de peixes. Instituto de Pesca. Associação Brasileira de Piscicultores e Pesqueiros. SP. Em: <<http://www.abrappesq.com.br/materias.htm>>. Acesso em: 15/07/2018.

VIEIRA, J.S., LOGATO, P.V.R., RIBEIRO, P.A.P., FREITAS, R.T.F., FIALHO, E.T. Efeito do processamento do milho sobre o desempenho e composição de carcaça de piaba (*Leporinus friderici*) criada em tanques-rede. **Ciência e Agrotecnologica**, v. 29, n. 2, p. 453-458, 2005.

WANG, Yan-Bo; LI, Jian-Rong; LIN, Junda. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. **Aquaculture**, v. 281, n. 1-4, p. 1-4, 2008.

WANG.J, LIU Y, JIAO.F, LI.W, GU.Y, LI.Y, GE.C, ZHOU.G, LI.B, ZHAO.Y, CHAI.Z, CHEN.C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. **Toxicology**, v. 254, n. 1-2, p. 82-90, 2008.

CAPITULO II

PROBIÓTICOS DO GÊNERO *Bacillus* EM DIETAS PARA PÓS-LARVAS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes níveis de probiótico em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo. Foram alojadas 1.680 pós-larvas de tilápia do Nilo, com peso médio inicial de $0,05 \pm 0,01$ g distribuídos em 24 aquários de 110 L, com 70 alevinos cada aquário, em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições, considerando como unidade experimental os aquários. Durante o experimento foram monitorados diariamente os parâmetros de qualidade de água utilizando sonda multiparâmetro portátil. Obtendo valores médios de temperatura $26,9 \pm 0,5$ °C, oxigênio $4,0 \pm 0,7$ mg/L, condutividade $170,1 \pm 46,6$ μ S/cm, pH $7,2 \pm 0,5$. Foi formulada uma dieta basal contendo inclusão de níveis de probiótico do gênero *Bacillus* $4,0 \times 10^{12}$ UFC (controle (0,0); 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10) g/100g de ração. Ao final do experimento, foram avaliados os parâmetros de desempenho zootécnico dos animais, aonde não apresentaram diferenças significativas. Apesar de os diferentes níveis de inclusão de probiótico do gênero *Bacillus* na dieta não proporciona desempenho zootécnico da tilápia do Nilo, recomenda-se a inclusão de 0,08g/kg de probiótico do gênero *Bacillus* por apresentar melhora na saúde intestinal das pós-larvas de tilápia do Nilo.

Palavras-Chave: aquicultura, nutrição, probióticos, alimento alternativo.

PROBIOTICS OF THE GENUS *Bacillus* IN NILE TILAPIA POST LARVES*(Oreochromis niloticus)*

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate different levels of probiotic in diets for Nile tilapia post-larvae. 1,680 Nile tilapia post-larvae were housed, with an initial average weight of 0.05 ± 0.01 g distributed in 24 aquariums of 110 L, with 70 fry each aquarium, in a completely randomized design with six treatments and four repetitions, considering aquariums as an experimental unit. During the experiment, water quality parameters were monitored daily using a portable multiparameter probe. Obtaining mean values of temperature 26.9 ± 0.5 ° C, oxygen 4.0 ± 0.7 mg / L, conductivity 170.1 ± 46.6 μ S / cm, pH 7.2 ± 0.5 . A basal diet containing the inclusion of probiotic levels of the genus *Bacillus* 4.0×10^{12} UFC (control (0.0); 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.10) g / 100g of feed. At the end of the experiment, the parameters of zootechnical performance of the animals were evaluated, where there were no significant differences. Although the different levels of inclusion of probiotic of the genus *Bacillus* in the diet does not provide zootechnical performance of Nile tilapia, it is recommended the inclusion of 0.08g / kg of probiotic of the genus *Bacillus* as it improves the intestinal health of post-larvae of Nile tilapia.

Keywords: aquaculture, nutrition, probiotics, alternative food.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido avanços em relação à produção na aquicultura, uma das espécies mais cultivadas e bem-sucedidas está sendo a tilápia *O. niloticus* (GUTIERREZ et al., 2017). Essa espécie apresenta requisitos que agrada ao consumidor por possuir carne branca, fácil filetagem e não haver espinha em “Y” (SOUZA, 2002).

Em cultivos os peixes são expostos diretamente na água que é favorável a proliferação de vários microorganismos presente no meio aquático sendo de natureza benéfica e patogênica (JATOBA et al., 2018; DE ANDRADE et al., 2018).

A aplicação de probióticos em meio de cultivo reduz a necessidade de aquisição de produtos antimicrobianos e parasiticidas consequentemente agentes quimioterapêuticos como antibióticos reduzindo impactos ambientais oriundo da atividade de piscicultura (HAI, 2015). Segundo Verschurer et al. (2000) e Jatoba et al. (2018) probiótico é definido como microorganismo vivo que tem efeito benéfico sobre o hospedeiro, alterando a comunidade microbiana agregada com o hospedeiro ou meio ambiente.

A incorporação de probióticos em dietas alimentares para peixes podem ser de várias formas de administração, sendo emulsões, liofilizados e liofilizados protegidos quantidade fornecida por peixe (%/kg) e frequência alimentar (HAI, 2015).

O objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes níveis de probióticos do gênero *Bacillus* em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) sobre desempenho zootécnico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudo em Manejo na Aquicultura (GEMAQ), na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Campus de Toledo, no período de janeiro a fevereiro de 2019, com duração de 45 dias.

Para a experimentação animal foi Submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) UNIOESTE, estando de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Aprovado sobre protocolo nº 61-19.

Peixe farinha tilápia (58)	23,78	23,78	23,78	23,78	23,78	23,78
Arroz quirera	13,43	13,43	13,43	13,43	13,43	13,43
Milho glúten (60)	8,16	8,16	8,16	8,16	8,16	8,16
Probiótico	0,00	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
Óleo de soja	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39
Supl. mineral e vit.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamina C	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Propianoto de cálcio	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
L-treonina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Fosfato bicálcico	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Níveis nutricionais						
Proteína bruta (%)	42,12	42,12	42,12	42,12	42,12	42,12
Proteína digestível (%)	38,60	38,60	38,60	38,60	38,60	38,60
Ed. tilápia (kcal/kg)	3500,00	3500,00	3500,00	3500,00	3500,00	3500,00
Amido (%)	17,38	17,38	17,38	17,38	17,38	17,38
Arginina total (%)	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01
Cálcio (%)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fibra bruta (%)	2,77	2,77	2,77	2,77	2,77	2,77
Fenilalanina total (%)	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04
Fósforo total (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Gordura (%)	6,91	6,91	6,91	6,91	6,91	6,91
Histidina total (%)	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Isoleucina total (%)	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78
Leucina total (%)	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61	3,61
Lisina total (%)	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34
Metionina total (%)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Treonina total (%)	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Triptofano total (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Valina total (%)	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95

Suplemento mineral e vitamínico - Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.750.000UI; Vit. D3, 375.000UI; Vit. E, 20.000UI; Vit. K3, 500mg; Vit. B1, 2.000mg; Vit.B2, 2.500mg; Vit.B6, 2.500mg; Vit. B12, 5.000mg; Ac. Fólico, 625mg; Pantotenato Ca, 7.500mg; Vit. C, 37.500mg; Biotina, 50mg; Inositol, 12.500mg; Niacina, 8.750mg; Co, 50mg; Cu, 1.250mg; Fe, 15.000mg; I, 100mg; Mn, 3.750mg; Se, 75mg; Zn, 17.500mg; Probiótico *Bacillus cereus* 4,0x10¹² UFC; Probiótico *Bacillus subtilis* 4,0x10¹² UFC.

As rações foram ofertadas em três fases:

Fase I - ração farelada nos primeiros 15 dias, sendo que primeiramente ela foi extrusada e posteriormente triturada para que não haver seletividade de partículas quando ofertado;

Fase II – alimentação com ração farelada e microextrusada para fazer uma transição alimentar em 10 dias para ração extrusada; e

Fase III - ração microextrusada até o término do cultivo experimental 20 dias.

Adaptação ao sistema de cultivo experimental

As pós-larvas passaram uma semana de adaptação no sistema de produção em água branca e foram alimentadas com ração controle, antes da oferta da dieta experimental para que ocorresse ambiência dos animais ao sistema. O arraçoamento realizou-se seis vezes ao dia às 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 e 18:00 horas, sendo a saciedade aparente.

Parâmetros físico-químico da água

Foram avaliados diariamente os parâmetros físico-químicos da água: temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido, monitorados com auxílio de uma sonda multiparâmetro YSI profissional. Sifonamento foi realizado às 07:30 e 18:30 antes da primeira e após a última alimentação para retirada dos metabolitos produzidos (resto de ração e fezes). Durante todo o período experimental foram mantidos os parâmetros de qualidade da água, estando dentro da faixa de conforto para a espécie em estudo, com valores médios de temperatura $26.9\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, oxigênio $4.0\pm 0,7\text{mg/L}$, condutividade $170.1\pm 46,6\ \mu\text{S/cm}$, pH $7.2\pm 0,5$ dentre das recomendações (SIBAÚBA-TAVARES 1995; DIAS, 2011; MELLO et al. 2013).

Ao final do experimento os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas e posteriormente anestesiados com eugenol, diluído em álcool etílico na proporção de 1ml/eugenol/10ml de álcool 98%, para a retirada de fígado e intestino para análises histológicas.

Analises laboratórios realizadas

Desempenho produtivo

As equações utilizadas na avaliação do desempenho zootécnico e retenção de nutrientes foram às seguintes: Ganho em peso médio (GPM) = (peso final – peso inicial); Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 \times [(In \text{ peso final} - In \text{ peso inicial}) / \text{número de dias}]$, Conversão alimentar aparente (CAA) = consumo de alimento/ganho em peso em dias; Taxa de retenção proteica (TRP) = $[(\text{peso final} \times \text{proteína corporal final}) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína inicial corporal}) / \text{proteína total ingerida}] \times 100$; Peso do estômago (PE); Peso do fígado (PF); Peso do intestino (PI); Comprimento do intestino (CI); Matéria úmida (UM); Matéria seca (MS); Sobrevivência (SO).

fígado e intestino

Foram coletadas amostras do intestino e fígado de cinco peixes de cada repetição para cada tratamento, as amostras foram fixadas em formol tamponado por 48 horas. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por duas horas e desidratada em etanol. Utilizou-se metodologia de rotina de acordo com Cargnin-Ferreira & Sarasquete Reiriz, (2008), para a inclusão em parafina a 58°C, utilizou-se xilol como líquido intermediário.

Após inclusão do material em parafina, os blocos resultantes foram cortados em micrótomo. Os cortes, com espessura de 5 μm , foram estirados e recolhidos em banho termostático a 52°C e dispostos sobre as lâminas. Os cortes foram desparafinizados conforme a metodologia de rotina e corados com a técnica de Cargnin-Ferreira & Sarasquete Reiriz, (2008). Para o cálculo do hepatócito média da área nuclear para cada fotografia foi calculado por planimétrica do perímetro e diâmetro segundo (STRÜSSMANN et al., 1990).

A obtenção das medidas de altura e altura padrão das vilosidades corresponderam à distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e do ápice das vilosidades até o término da serosa, respectivamente; a largura das vilosidades e a espessura do epitélio também foram medidas segundo MELO, (2013).

Análises bromatológicas

As análises da composição bromatológica de Umidade (UM), Proteína Bruta (PB), Lipídeos (LP) e Cinzas (CZ) foram realizadas através da metodologia descrita por (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância One-Way ANOVA e homogeneidade as médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desempenho zootécnico os resultados não apresentaram valores significativos entre os tratamentos por inclusão de probiótico do gênero *Bacillus* como está demonstrado na (Tabela 2), semelhante ao estudo realizado por Batista et al. (2016), o ganho de peso não diferiu sobre os grupos estudados bem como os índices de crescimento diário e conversão alimentar.

Tabela 2. Parâmetros de desempenho produtivo de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados diferentes níveis de probióticos.

Parâmetro	Níveis de probióticos (g/100g)						P-valor
	Controle	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	
¹ PI (g)	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	ns
² PF (g)	11,88±0,71	12,52±0,52	11,47±0,40	13,63±2,42	11,50±0,68	12,22±0,48	ns
³ GP (g)	11,83±0,71	12,47±0,52	11,42±0,40	13,58±2,42	11,44±0,67	12,17±0,48	ns
⁴ GPD (g dia ⁻¹)	0,25±0,01	0,26±0,01	0,24±0,01	0,28±0,05	0,24±0,01	0,25±0,01	ns
⁵ CAA	0,98±0,09	0,92±0,08	1,03±0,01	0,98±0,05	0,96±0,08	0,95±0,02	ns
⁶ TCE	24,64±1,48	25,98±1,07	23,78±0,83	28,30±5,05	23,84±1,41	25,35±1,01	ns
⁷ S (%)	65,00±1,82	66,50±3,11	67,00±1,41	60,25±11,70	69,25±0,50	67,75±0,96	ns
⁸ CT (cm)	7,10±0,10	7,12±0,15	7,02±0,15	7,36±0,62	6,95±0,14	7,07±0,14	ns
⁹ CI (cm)	51,95±6,79	46,53±8,77	49,78±6,15	47,25±7,02	48,98±7,56	51,70±6,91	ns
¹⁰ IVS	8,32±1,53	6,79±1,95	7,59±2,44	7,58±2,97	7,47±1,91	7,71±2,37	ns
¹¹ IHS	1,57±0,48	1,20±0,25	1,28±0,45	1,25±0,42	1,47±0,34	1,53±0,42	ns

Valores expressos em média ± desvio padrão; Valores seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05). ns – não significativo. * – significativo. ¹Peso Inicial (PI); ²Peso Final (PMF); ³Ganho de Peso (GP); ⁴Ganho em peso diário (GPD); ⁵Conversão Alimentar Aparente (CAA); ⁶Taxa de Crescimento Específico (TCE); ⁷Sobrevivência (S); ⁸Comprimento total (CT); ⁹Comprimento do intestino (CI); ¹⁰Viscerossomático (IVS); ¹¹Hepatossomático (IHS).

Dias et al. (2011) ao realizarem um estudo de desempenho com pós-larvas de matrinxã, *Brycon amazonicus*, observaram que não houve uma melhora entre ganho de peso e sobrevivência entre o tratamento controle comparando com os animais alimentados com dietas suplementadas com probióticos

O desenvolvimento de animais mantidos em boas condições de manejo dificilmente é influenciado pela ação de dietas contendo probióticos (LIMA et al., 2003), tendo em vista que o contendo de microrganismos é mínimo por não possuir tempo hábil para colonizar o trato intestinal, dos peixes que consumiram ração com probióticos apresentando ganho de peso equivalente aos que receberam rações sem a inclusão de probiótico (FERREIRA et al., 2015).

Para índices de desempenho observados no presente trabalho, corrobora o estudo realizado por Carvalho et al. (2011), onde utilizou probióticos na ração, e relata não ter observado influência na a sobrevivência, conversão alimentar aparente bem como o índice hepatossomático dos peixes. Schwarz et al. (2010) ao trabalharem com dietas contendo manoligossacarídeos para juvenis de tilápia do Nilo, não observaram efeito dos níveis de inclusão sobre o ganho de peso, consumo de ração, índice hepatossomático e rendimento de carcaça.

Com relação a composição da carcaça de tilápia do Nilo, não apresentou diferenças para proteína, umidade, lipídio e cinzas ($p > 0,05$) (Tabela 3), estando de acordo com o experimento realizado por (LIU et al., 2018), que analisando o musculo dorsal do peixe papagaio em um estudo com probióticos na ração o resultado não diferiu entre os tratamentos para umidade, proteína, lipídios e cinzas com peixes alimentados com dietas experimentais durante 56 dias.

Tabela 3. Composição centesimal de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados diferentes níveis de probióticos.

Variável	Níveis de probióticos (g/100g)						Valor-p
	Controle	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	
¹ UM (%)	77,78±0,96	77,58±0,59	77,62±0,69	77,58±0,90	77,47±0,43	77,70±0,46	ns
² PB (%)	14,89±0,98	14,61±0,45	14,72±0,29	14,49±0,74	15,04±0,61	14,66±0,40	ns
³ PL (%)	4,01±0,51	4,16±0,44	4,16±0,57	4,25±0,90	3,92±0,39	3,90±0,61	ns
⁴ CZ (%)	0,40±0,03	0,39±0,03	0,38±0,01	0,43±0,02	0,41±0,02	0,40±0,01	ns

Valores expressos em média \pm desvio padrão; Valores seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ns – não significativo. * – significativo. ¹Umidade (UM); ²Proteína bruta (PB); ³Lipídio (LP); ⁴Cinzas (CZ).

¹ AV	141,7±41,4	143,9±34,8	142,2±43,5	145,2±63,7	120,9±41,4	122,5±28,3	ns
² LV	63,2±17,1a	61,7±10,7a	58,5±11,9a	53,2±14,4ab	44,5±11,2bc	41,0±7,7c	*0,00
³ ET	49,8±9,3a	48,9±12,0ab	42,8±9,7ab	40,8±11,0b	30,9±8,6c	27,7±7,2c	*0,00

Médias seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05). ns – não significativo. * – significativo. ¹Altura dos vilos (AV), ²Largura dos vilos (LV), ³Espessura da túnica (ET).

Segundo Caspary (1992), Batista et al. (2016) ao trabalharem com dietas com suplementação com probióticos com a espécie *Solea senegalensis* avaliaram o intestino e observaram um aumento na área da secção, do comprimento das vilosidades e da largura dos vilos onde relaciona o aumento da área superficial que indica uma melhora na capacidade de absorção dos nutrientes. VINCENT (1959), WALKER & DUFF (1998), ROCHA et al. (2016), explicam como atua o probiótico *Bacillus subtilis* como proteção de forma antimicrobiana para os vilos e superfícies absorptivas contra microrganismos patogênicos em peixes.

Para Caballeiro et al. (2004), a análise histológica do sistema digestivo é considerada um bom indicador do estado nutricional do peixe. O intestino possui suma importância na digestão e absorção de nutrientes dos alimentos, monitorização destes órgãos é considerado necessário (ROBERTS, 1989). Existe vários métodos de análise histológica que são utilizados, na maioria das vezes sistema de pontuação semiquantitativo, método histoquímica e imuno-histoquímica, enquanto os métodos estereológicos são raramente utilizados (RAŠKOVIĆ et al. 2011).

Segundo Fabregat et al. (2011), estudaram as vilosidades intestinal em juvenis de pacu concluíram que componentes que contêm fibras presente na ração influencia negativamente no desempenho e na morfologia do intestinal dos peixes. Schwarz et al., (2018) avaliaram as vilosidades intestinal de jundiá rosa onde obteve (p<0,05), já por sua vez no mesmo estudo comparou com o jundiá cinza que apresentou maior vilosidade intestinal e melhor desempenho zootécnico tornando o jundiá rosa inviável para piscicultura. Amaral Júnior et al. (2015), salientaram que os vilos auxiliam na digestão e na absorção intestinal, portando a integridade dos vilos influenciam em melhores conversão alimentar.

Com o estudo realizado observou-se melhora na saúde intestinal das pós larvas de tilápia do Nilo no tratamento (0,08 e 0,10g) de probiótico na ração, para largura dos vilos 44,5±11,2 e 41,0±7,7 com (p<0,05) (Tabela 5). Através da análise estatística para espessura da túnica foi observado que as camadas serosas e musculares não apresentaram patologias. Estudos realizados por Stabille et al. (1998) avaliaram a parede do intestinal de

Cyprinos carpio aonde é constituída pelas túnicas serosa e muscular contendo feixes de colágenos. Curry, (1939) relata sobre a túnica muscular que tem presença de tecidos vasculares sanguíneo que transportam os nutrientes.

Avaliando o hepatócito de pós-larvas de tilápia do Nilo (Figura 2), observou-se que não apresentou esteatose e necrose hepática no fígado dos peixes no experimento realizado com dietas suplementadas com bactérias probióticas do gênero *Bacillus*, entre as variáveis estudadas foram perímetro, área e volume do núcleo, onde não houve diferenças entre os grupos tratados em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 5).

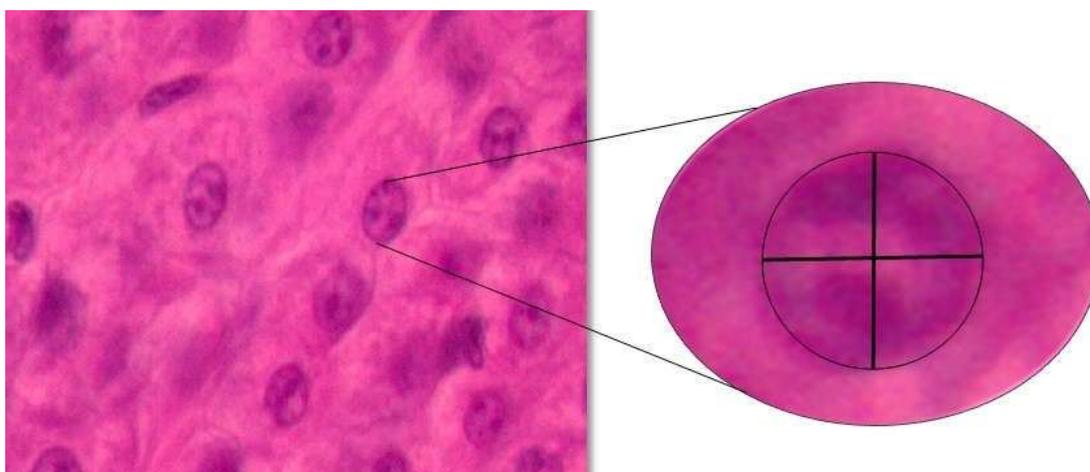


Figura 2. Corte histológico à 5 μ do fígado de pós-larva tilápia do Nilo, demonstrando as medidas perímetro, área e volume do núcleo do hepatócito.

Tabela 5. Histologia dos fígados de pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados diferentes níveis de probióticos.

Variável	Níveis de probióticos (g/100g)						Valor-p
	Controle	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	
¹ PN	9,5 \pm 0,4	10,0 \pm 1,4	9,5 \pm 0,3	9,6 \pm 0,2	9,6 \pm 0,2	9,5 \pm 0,2	ns
² ÁN	22,7 \pm 2,3	23,9 \pm 1,8	22,8 \pm 1,8	23,0 \pm 1,2	23,4 \pm 1,3	22,7 \pm 1,4	ns
³ VN	56,9 \pm 8,3	61,7 \pm 6,8	57,5 \pm 6,8	58,1 \pm 4,7	59,6 \pm 5,0	57,0 \pm 5,2	ns

Médias seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ns – não significativo. * – significativo. ¹Perímetro do núcleo (PN), ²Área do núcleo (AN), ³Volume do núcleo (VN).

Conforme Bolla et al. (2011), que mudanças no fígado revela informações do estado nutricional dos peixes. Características estruturais dentro dos hepatócitos tem relação direta com os teores de proteínas não-cromossômica dos núcleos (STRÜSSMANN et al.,

1990). As alterações hepáticas no fígado são facilmente identificadas quando a dietas não supri as exigências nutricionais dos peixes, sendo as mudanças mais comuns: vascularização, gordura no fígado e necrose hepática.

Conforme Caballero et al. (2004) e Raskovic et al. (2011), proteínas de alimentos ou gordura podem modificar as estruturas do fígado, no entanto o aumento do tamanho do núcleo revela alterações no metabolismo ocasionando necroses hepáticas ou esteatose. Com o estudo realizado não houve anormalidade no núcleo do hepatócito quando ofertado a dieta experimental contendo probióticos do gênero *Bacillus* ($p > 0,05$).

De acordo com, Raskovic et al. (2016) os hepatócitos podem conter vacúolos lipídicos pequenos e grandes, ou até mesmo vacúolos irregulares. No presente estudo observou-se pequenos vacúolos lipídicos, onde esses não alteraram os parâmetros estudados para fígado.

4. CONCLUSÃO

Apesar de, os diferentes níveis de inclusão de probiótico do gênero *Bacillus* na dieta não influenciarem no desempenho zootécnico da tilápia do Nilo, recomenda-se a inclusão de 0,08g/kg de probiótico do gênero *Bacillus* por apresentar melhora na saúde intestinal das pós-larvas de tilápia do Nilo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ASADUZZAMAN, M., SOFIA, E., SHAKIL, A., HAQUE, N. F., KHAN, M. N. A., IKEDA, D., & ABOL-MUNAFI, A. B. Host gut-derived probiotic bacteria promote hypertrophic muscle progression and upregulate growth-related gene expression of slow-growing Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports*, 9, 37-45. 2018.

BATISTA, S., MEDINA, a., PIRES, M.A., MORIÑIGO, M.A., SANSUWAN, K., FERNANDES, O.M.J., VALENTE, L.M.P & OZÓRIO, R.O.A. Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 100, n. 16, p. 7223-7238, 2016.

BOLLA, S; NICOLAISEN, O; AMIN, A. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. *Aquaculture*, v. 312, n. 1-4, p. 117-125, 2011.

CABALLERO, M. J; IZQUIERDO, M.S; KJORSVIK, E; FERNANDEZ END ROSEN LUND. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, v. 27, n. 9, p. 531-541, 2004.

CARGNIN-FERREIRA, E.; SARASQUETE REIRIZ, M.C. **Histofisiología de moluscos bivalvos marinos**. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, p. 94, 2008.

CARGNIN-FERREIRA, EDUARDO; SARASQUETE, CARMEN. **Histofisiología de moluscos bivalvos marinos**. Editorial CSIC-CSIC Press, 2008.

CARVALHO, J.V., LIRA, A.D., COSTA, D.S.P., MOREIRA, E.L.T., PINTO, L.F.B. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com " *Bacillus subtilis*" ou mananoligossacarídeo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 12, n. 1, 2011.

CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; COSTA, D.S.P.; MOREIRA, E.L.T.; PINTO, L.F.B.; ABREU, R.D.; ALBINATI, R.C.B. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do -Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal [online]*, v.12, n.1, p.176–187, 2011.

DE ANDRADE, L. A. R; DE AZEVEDO, T. M. P. Manejo experimental de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), alimentados com ração comercial e pre/probióticos. *PUBVET*, v. 12, p. 133, 2018.

DIAS, D.C; CORRÊA C.F; LEONARDO, A.F.G; TACHIBANA,L; ROMAGOSA, E; RANZANI-PAIVA,M.J.Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 33, n. 4, p. 365-368, 2011.

FERREIRA, A.H.C., ANTONIASSI, N.A.B., SILVA, F.G., POVH, J.A., POTENÇA, A., MORAES, T.C.H., SILVA, T.K.S.T., ABREU, J.S. Probiótico na alimentação de pós-larvas de tilápias-do-nilo submetidas a desafio sanitário. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 16, n. 2, 2015.

GUTIÉRREZ, V.Y; ROJAS C. M; SUAREZ, S, L. Effect of probiotic microorganisms isolated from *Hypostomus plecostomus* in *Oreochromis* sp juveniles. **Revista MVZ Córdoba**, v. 22, n. 1, p. 5694-5705, 2017.

HAI, V. N. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 2, p. 592-597, 2015.

HAYASHI, C., BOSCOLO, W.R., SOARES, C.M., BOSCOLO, V.R., GALDIOLI, E.M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 21, p. 733-737, 1999.

IRIBARREN, D, DAGA, P, MOREIRA, M.T, FEIJOO, G. Potential environmental effects of probiotics used in aquaculture. **Aquaculture international**, v. 20, n. 4, p. 779-789, 2012.

JATOBÁ, A; MORAES, N.K; RODRIGUES, F.E; VIEIRA, M.L; PEREIRA, O.MI. Frequency in the supply of *Lactobacillus* influence its probiotic effect for yellow tail lambari. **Ciência Rural**, v. 48, n. 10, 2018.

LAZADO, C.C., CAIPANG, C.M.A. Mucosal immunity and probiotics in fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 1, p. 78-89, 2014

LIMA, A.C.F.; PIZAURO JR., J.M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E.B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. National academies press, 2011.

RAŠKOVIĆ, B., ČIČOVAČKI, S., ĆIRIĆ, M., MARKOVIĆ, Z., & POLEKSIĆ, V. Integrative approach of histopathology and histomorphometry of common carp (*Cyprinus carpio* L.) organs as a marker of general fish health state in pond culture. *Aquaculture Research*, V. 47, n. 11, p 3455-3463, 2016.

RAŠKOVIĆ, B.S; STANKOVIĆ M, B; MARKOVIĆ AND VESNA D. POLEKSIĆ'. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)**, v. 56, n. 1, p. 87-100, 2011.

ROBERTS, R. J. *Fish pathology*, London: Bailliere Tindall. 1989.

ROCHA, P., BARROS, M. E., & EVÊNCIO-NETO, J. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36 v.4, p.312-316, (2016).

SANTO, E.F.E; GRASSI, T.L.M; MARCOS, M.T.S; OLIVEIRA, D.L; CAVAZZAN, J.F; CIARLINI, P.C; NARCISO, L.G; TORRES, A.A; GONÇALVES, G.S; ABIMORAD, E.G; PONSANO, E.H.G. Desempenho, sanidade animal e qualidade de filés de tilápias alimentadas com ração suplementada com biomassa bacteriana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 525-534, 2016.

SCHWARZ, K.K.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M.; MICHELATO, M.; GUALDEZI, M. C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, v.32, n.2, p.197-203, 2010.

SIBAÚBA-TAVARES, L. H. Limnologia Aplicada à Aquicultura. **Funep, Jaboticabal**, v. 70, 1995.

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

SOUZA, M. L. R. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de filé e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1076-1084, 2002.

STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). **Journal of Fish Biology**, v. 36, n. 1, p. 59-65, 1990.

VERSCHUERE, L; ROMBAUT, G; SORGELOOS, P; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

VIEIRA, J.S., LOGATO, P.V.R., RIBEIRO, P.A.P., FREITAS, R.T.F., FIALHO, E.T. Efeito do processamento do milho sobre o desempenho e composição de carcaça de piaba (*Leporinus friderici*) criada em tanques-rede. **Ciência e Agrotecnológica**, v. 29, n. 2, p. 453-458, 2005.