

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**EFEITO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E
RESPOSTA AO ESTRESSE DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*) E JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lucas Centenaro

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**EFEITO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E RESPOSTA
AO ESTRESSE DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*)**

Lucas Centenaro

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Leonardo José Gil Barcelos

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA DE MESTRADO EM
BIOEXPERIMENTAÇÃO**


A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado


**EFEITO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E RESPOSTA
AO ESTRESSE DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*)**

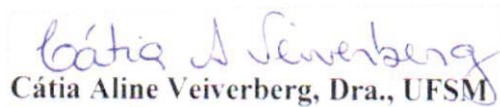
Elaborada por
Lucas Centenaro

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora


Leonardo José Gil Barcellos, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)


Michele Fagundes, Dra., UPF


Cátia Aline Veiverberg, Dra., UFSM

Passo Fundo, RS, Brasil
2016

CIP – Catalogação na Publicação

C397eCentenaro, Lucas

Efeito de probiótico sobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e jundiá (*Rhamdia quelen*)/Lucas Centenaro. – 2016.

58f.: il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof.Dr. Leonardo José Gil Barcelos.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2016

1. Peixe - Criação. 2. Tilápia (Peixe). 3. Jundiá (Peixe). 4.
Stress (Fisiologia). I. Barcelos, Leonardo José

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues

Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

Ao querido Espírito Santo que me sustenta, me dá sabedoria, me consola, me direciona e que revela através de sua maravilhosa criação o quão perfeito e maravilhoso Ele é, desde a pequena bactéria, até o grandioso universo. Deus, o Teu amor enche todas as coisas, nosso conhecimento é tão limitado comparado a Sua maravilhosa sabedoria, só o Senhor para criar tudo isso tão perfeito. Obrigado por me amar.

A minha querida e amada esposa Katiúcia, meu maior presente, obrigado por estar sempre ao meu lado, pelo amor, apoio e compreensão e por compartilhar comigo essa alegria.

Ao meu orientador Leonardo Barcellos, obrigado por me receber, por me ensinar, pela oportunidade, e por todos esses anos de formação ao seu lado.

A professora Michele Fagundes, a querida Rosmari Mezzalana e aos colegas João Gabriel Santos da Rosa, Gessi Koakoski, pela ajuda, apoio, incentivo e conselhos, sem vocês nada disso seria possível.

Aos colegas do laboratório, pela ajuda, pela disposição, por tantas vezes abrir mão de seu precioso tempo para me auxiliar na concretização deste trabalho, que Deus os abençoe;

A empresa Sustenta Agroambiental, em especial ao Rafael, Marcos e ao querido Tarso (*in memoriam*) pelo incentivo, pelo apoio, pelo material e por tornar esse sonho possível.

A professora Laura Beatriz Rodrigues e ao professor Luiz Carlos Kreutz, pelo apoio, conselhos e ajuda.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada esposa e a minha querida família, amo vocês!

EPÍGRAFE

"O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é entendimento."

Rei Salomão – Bíblia Sagrada

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 TILÁPIA-DO-NILO.....	18
2.2 JUNDIÁ(<i>Rhamdiaquelen</i>)	19
2.3 RESPOSTA ENDÓCRINA AO ESTRESSE.....	20
2.4 PROBIÓTICO.....	20
2.5 AÇÃO PROBIÓTICA NO ESTRESSE DE PEIXES.....	22
2.6 CONDIÇÕESPARAVIABILIZAR O DESENVOLVIMENTO DO PROBIÓTICO.....	23
2.7 BACILLUS.....	23
3. CAPÍTULO 1	25
3.1 RESUMO.....	25
3.2 ABSTRACT	25
3.3 INTRODUÇÃO.....	26
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.4.1 Delineamento experimental	28
3.4.1.1 Experimento 1 - Avaliaçãodo efeito probióticossobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse em Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	28
3.4.1.1.1 Fase 1: Avaliação do efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico.....	28
3.4.1.1.2 Fase 2: Avaliação do efeito probiótico na resposta ao estresse.....	29
3.4.1.2 Experimento 2 - Avaliaçãodo efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse em Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromisniloticus</i>).....	30
3.4.1.2.1 Fase 1:Avaliação do efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico.....	30
3.4.1.2.2 Fase 2: Avaliação do efeito probiótico na resposta ao estresse.....	31
3.4.2 Análise estatística	32
3.4.3 Nota ética	32
3.5 RESULTADOS.....	32
3.5.1 Experimento Com Jundiás (<i>RhamdiaQuelen</i>)	32
3.5.1.1 Desempenho zootécnico.....	32
3.5.1.1.1 Peso.....	32
3.5.1.1.2 Comprimento padrão.....	34
3.5.1.1.3 Ganho médio por dia.....	35
3.5.1.1.4 Taxa específica de crescimento.....	36
3.5.1.1.5 Biomassa Final.....	36
3.5.1.1.6 Índice Hepato-Somático.....	37
3.5.1.1.7 Parâmetros de qualidade de água.....	39
3.5.1.2 Cortisol.....	39
3.5.2 Experimento Com Tilápias-do-Nilo (<i>OreochromisNiloticus</i>)	40
3.5.2.1 Desempenho Zootécnico.....	40
3.5.2.1.1 Peso.....	40
3.5.2.1.2 Comprimento Padrão.....	41
3.5.2.1.3 Ganho por dia.....	42
3.5.2.1.4 Taxa específica de crescimento.....	43
3.5.2.1.5 Biomassa Final.....	43

3.5.2.1.6	<i>Parâmetros de qualidade da água</i>	44
3.5.2.2	Cortisol.....	44
3.6	DISCUSSÃO.....	45
4.	CONCLUSÕES	50
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6.	REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1.	Estimativas de peixes, camarões e outros organismos aquáticos cultivados no Brasil em 2014 (3).....	18
-----------	---	----

3.5 RESULTADOS

FIGURA 2.	Disposição dos tratamentos na fase 1.....	29
FIGURA 3.	Disposição dos tratamentos na fase 2 referente ao experimento com Jundiás.....	30
FIGURA 4.	Disposição dos tratamentos na fase 2 referente ao experimento 1.....	31
FIGURA 5.	Peso médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. O valor de P indica o nível de significância enquanto NS indica que não houve diferença.....	33
FIGURA 6.	Peso médio dos peixes de cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	33
FIGURA 7.	Evolução dos pesos (A) e coeficiente de variação dos pesos médios dos peixes nas diferentes condições (B).Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	34
FIGURA 8.	Evolução dos comprimentos. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	34
FIGURA 9.	Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. O valor de P indica o nível de significância enquanto NS indica que não houve diferença.	35
FIGURA 10.	Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada unidade experimental.Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	35
FIGURA 11.	Ganho em peso por dia dos peixes nas diferentes condições.Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.....	36
FIGURA 12.	Taxa específica de crescimento dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.....	36
FIGURA 13.	Biomassa final, taxa de sobrevivência e peso médio final dos peixes nas diferentes situações e seus respectivos coeficientes de variação. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.....	37
FIGURA 14.	Evolução do IHS no período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias.....	37
FIGURA 15.	Índice hepato-somático (IHS) médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período.em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo	

	teste T de Student. NS indica que não houve diferença.....	38
FIGURA 16.	Índice hepato-somático (IHS) médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	38
FIGURA 17.	Concentrações de cortisol plasmático em Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) submetidas ou não ao estresse agudo, obtidas 1 hora após estresse. S-: Grupos não estressados; S+: Grupos estressados; PROB-: Grupos alimentados com ração sem adição de probiótico; PROB+: Grupos alimentados com ração contendo probiótico. Médias comparadas por Análise de Variância(ANOVA) de duas vias (valores de P e F no texto).....	39
FIGURA 18.	Peso médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.....	40
FIGURA 19.	Peso médio dos peixes de cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	40
FIGURA 20.	Evolução dos pesos (A) e coeficiente de variação dos pesos médios (B) dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias.....	41
FIGURA 21.	Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria em todo o período.Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.....	41
FIGURA 22.	Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.....	42
FIGURA 23.	Evolução dos comprimentos no período.Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias.....	42
FIGURA 24.	Ganho em peso por dia dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student....	43
FIGURA 25.	Taxa específica de crescimento dos peixes nas diferentes condições.Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.....	43
FIGURA 26.	Biomassa final, taxa de sobrevivência e peso médio final dos peixes nas diferentes situações e seus respectivos coeficientes de variação.Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.....	44
FIGURA 27.	Concentrações de cortisol plasmático em Tilápias-do-Nilo submetidas ou não ao estresse agudo, obtidas 1 hora após estresse. S-: Grupos não estressados; S+: Grupos estressados; PROB-: Grupos alimentados com ração sem adição de probiótico; PROB+: Grupos alimentados com ração contendo probiótico; Os asteriscos indicam diferença entre os grupos.Médias comparadas por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (valores de P e F no texto).....	45

LISTA DE TABELAS

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 1.	Parâmetros zootécnicos avaliados, fórmula de obtenção e unidade de expressão dos dados.....	28
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%/dia	Porcentagem por dia
± DP	Desvio Padrão máximo e mínimo
± SD	Desvio Padrão máximo e mínimo
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
C x T	Controle vs Tratamento
CEPAGRO	Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária
cm	Centímetro
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Gramma
g/dia	Gramma por dia
h	Hora
Hab	Habitantes
HHI	Hipotálamo Hipófise Interrenal
kcal/kg	Quilocalorias por quilograma
Kg	Quilogramas
Kg/hab/ano	Quilograma por habitante por ano
L/min	Litros por minuto
Log	Logaritmo
mg/L	Miligramma por litro
NS	Não significativo
°C	Graus Celsius
P	Nível de significância
PROB-	Grupos alimentados com ração sem adição de probiótico
PROB+	Grupos alimentados com ração contendo probiótico
rpm	Rotações por minuto
S-	Grupos não estressados
S+	Grupos estressados
SNC	Sistema Nervoso Central
TEC	Taxa Específica de Crescimento
ufc/g	Unidade formadora de colônia por grama
UPF	Universidade de Passo Fundo

RESUMO
Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**EFEITO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E RESPOSTA
AO ESTRESSE DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*)**

Autor: Lucas Centenaro
Orientador: Leonardo J. G. Barcelos
Passo Fundo, 30 de setembro de 2016

Melhorar a resposta ao estresse é um dos principais desafios na produção intensiva de pescado, pois o desequilíbrio fisiológico gerado, quando não restaurado, causa problemas no desempenho e na saúde do peixe. Como alternativa, uma formulação probiótica foi testada em duas espécies filogeneticamente distantes, Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o Jundiá (*Rhamdia quelen*) com o objetivo de avaliar o efeito sobre o desempenho zootécnico e a resposta ao estresse. Num primeiro momento quatro caixas de fibra de 1000 litros formaram o grupo controle, alimentados com ração sem probiótico, e quatro formaram o grupo tratado, alimentados com ração adicionada de probiótico. Durante o período de 84 dias (Jundiá) e 54 dias (Tilápias-do-Nilo) parâmetros zootécnicos foram avaliados. Numa segunda etapa os animais, tratados ou não, foram desafiados com estresse físico e amostras de sangue coletadas para determinar os níveis de cortisol. Desta forma, concluímos que o probiótico reduz o estresse em Tilápias-do-Nilo, mas não em Jundiás, e em ambas as espécies o probiótico não interfere no desempenho zootécnico.

Palavras chaves: Estresse, *Oreochromis niloticus*, *Rhamdia quelen*, probiótico, cortisol.

ABSTRACT**Master's Dissertation****Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação****Universidade de Passo Fundo****PROBIOTIC EFFECT ON PERFORMANCE AND RESPONSE TO STRESS ON
NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) and JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Author: Lucas Centenaro

Advisor: Leonardo J. G. Barcellos

Passo Fundo, september 30, 2016

Improve the response to stress is a major challenge in the intensive fish production because physiological imbalance generated when unrestored, causes problems in the performance and health of the fish. Alternatively, a probiotic formulation was tested in two phylogenetically distant species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Jundia (*Rhamdia quelen*) in order to evaluate the effect on the performance and the stress response. At first four 1000 liter fiber boxes formed the control group fed diet without probiotic and four formed the group treated, fed feed with added probiotic. During the period of 84 days (Jundia) and 54 days (Nile Tilapia) zootechnical parameters were evaluated. In a second step the animals, treated or not, were challenged with physical stress and blood samples collected to determine cortisol levels. Thus, we conclude that the probiotic reduces stress in Niletilapia, but not Jundias, and in both species probiotic does not interfere on the performance.

key words: Stress, *Oreochromis niloticus*, *Rhamdia quelen*, probiotic, cortisol.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado em 2012 girou em torno de 158 milhões de toneladas, deste total, 66,6 milhões de toneladas (48,9%) é oriunda da produção aquícola(57).

No Brasil a aquicultura alcançou em 2014 uma produção estimada de 600 mil toneladas de pescado, destacando que dentre os setores de carnes, ela foi a que apresentou maior crescimento entre 2004 e 2014, em média 8% ao ano (57).

A Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie que lidera a produção aquícola no Brasil (57), seu amplo cultivo está relacionado ao rápido crescimento, adaptação ao confinamento; crescimento e reprodução em lagoas, lagos e reservatórios de água doce ou salobra, fácil cultivo com outras espécies, (8) e hábito alimentar onívoro, aceitando rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação. (23).

Já na região sul do País, o Jundiá (*Rhamdia quelen*) tem despertado grande atenção de pesquisadores e produtores de peixes graças às várias características favoráveis como a prolicidade, robustez e bom ganho em peso. A espécie tem sido intensivamente pesquisada tanto em pesquisa aplicada, como alternativa de produção de peixes (11, 92,93), pois possui excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para pesca esportiva quanto para alimentação, com características propícias ao processamento (25). Bem como em pesquisa básica, como por exemplo, na resposta ao estresse (13, 15) possuindo ações muito semelhantes com outras famílias de peixes, podendo ser usado como um modelo de pesquisa para outros bagres em todo o mundo (56).

Apesar do crescimento da produção aquícola em cativeiro no Brasil e no mundo, a atividade apresenta ainda um grande potencial de expansão, e há necessidade de adequação das práticas e estruturas que possibilitem uma maior eficiência na produção (57). No entanto, para alcançar a importância esperada, diversas dificuldades de natureza econômica, tecnológica e ambiental precisam ser superadas.

Uma das principais dificuldades envolvidas na prática intensiva da aquicultura é o inevitável estresse enfrentado pelos peixes durante o cultivo, resultante de várias práticas que incluem a manipulação, seleção, classificação, transporte, estocagem, mudanças ambientais abruptas, entre outros.(17).

Estresse é o comprometimento do equilíbrio homeostático do organismo, que por sua vez, desencadeia um conjunto complexo de respostas adaptativas a fim tornar a restabelecer este equilíbrio. Caso a intensidade do estressor persistir por um período prolongado, o mecanismo de resposta fisiológica pode ser comprometido causando problemas

para o desempenho e saúde do peixe. (16). Para avaliar esse nível de tensão causado pelo estresse, a elevação do cortisol do plasma é a principal resposta hormonal utilizada como indicador (20).

À luz destas considerações, é necessário fornecer alternativas para a aquicultura que auxiliem o peixe na resposta aos desafios de estresse, e no aumento do desempenho zootécnico, garantindo melhor saúde, bem estar, produção e retorno financeiro.

Alguns estudos sugerem que probióticos bacterianos poderiam responder a essas exigências, uma vez que são adjuvantes microbianos vivos que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro. Modificando sua comunidade microbiana ou do ambiente associado, assegurando uma melhor utilização do alimento ou melhorando seu valor nutricional, reforçando a resposta do hospedeiro à doença, ou melhorando a qualidade do ambiente que o envolve (98). Autores tem demonstrado que fornecer probiótico para peixes melhora a taxa de crescimento e sobrevivência e reduz os níveis de cortisol, permitindo uma melhor resposta ao estresse. (27,95).

Um dos candidatos para o uso como probiótico são as Bactérias do gênero *Bacillus*, devido as suas características de secretar muitas exoenzimas, competir por espaço e nutrientes, deslocar bactérias não desejáveis no intestino, inibir o crescimento de outras bactérias (66), e também por sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal (50), sua elaboração, transporte e armazenamento das rações (44).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar o potencial de um probiótico multiespécies do gênero *Bacillus* no desempenho zootécnico e na resposta ao estresse físico agudo de duas espécies filogeneticamente distantes, o Jundiá (*Rhamdia quelen*), espécie nativa de hábitos noturnos, e a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie exótica de hábitos diurnos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TILÁPIA-DO-NILO

A Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence a seguinte classificação taxonômica: **Classe:** *Actinopterygii*, **Série:** *Teleostei*, **Ordem:** *Perciformes*, **Família:** *Cichlidae*, **Gênero:** *Oreochromis*, **Espécie:** *Oreochromis niloticus*. (36)

É uma das espécies mais importantes economicamente cultivadas no mundo, tem sua origem na África, e embora seja uma espécie exótica ela está geograficamente distribuída em mais de 97 países, em todos os continentes, seja como nativa ou como uma espécie introduzida (87).

A Tilápia em 2014 alcançou mundialmente uma produção de 4,2 milhões de toneladas, sendo o segundo grupo entre os peixes mais produzidos no mundo (34).

No Brasil, a Tilápia lidera a produção aquícola com cerca de 260 mil toneladas produzidas em 2014, 31% a mais que as 198 mil toneladas produzidas em 2011 (FIGURA 1) (3).

Principais grupos da aquicultura Brasileira - 2014 (valores em toneladas)

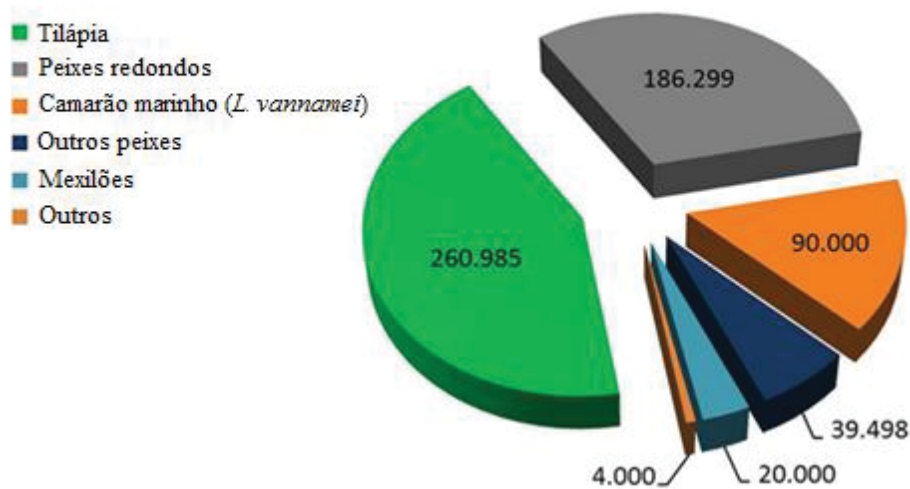


FIGURA 1. Estimativas de peixes, camarões e outros organismos aquáticos cultivados no Brasil em 2014 (3)

Seu amplo cultivo está relacionado ao seu rápido crescimento, sua rusticidade, adaptação ao confinamento, tolerância, crescimento e reprodução em lagoas, lagos e reservatórios de água doce ou salobra, o fácil cultivo com outras espécies, (8) e por possuir

hábito alimentar onívoro, aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação (23).

Ela é uma espécie tropical que prefere viver em águas rasas e o conforto térmico está entre 29 e 31°C e para de se alimentar abaixo de 17°C, aguenta baixas concentrações de oxigênio, mas as concentrações devem ser mantidas acima de 2,0 a 2,5 mg/L, o pH ideal é entre 6-9, e a amônia é tóxica acima de 0,5 mg/L podendo tolerar concentrações de até 0,9 por algum tempo, no entanto há prejuízo no crescimento (74).

2.2 JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie que ocorre naturalmente no sul da América do Sul e pertence a seguinte classificação taxonômica Classe: *Osteichthyes*, Série: *Teleostei*, Ordem: *Siluriformes*, Família: *Heptapteridae*, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia quelen* (53).

É uma espécie considerada euritérmica, ou seja, tolera temperaturas que variam de 17 a 32 °C, o que caracteriza a sua rusticidade podendo suportar o intenso inverno na região sul do Brasil e potencializar seu crescimento no verão. Os níveis ideais de oxigênio na água para seu crescimento é próximo a 7,5 mg/l, tolera pH na faixa de 4,0 a 9,0, cresce melhor em águas com dureza entre 30-70 mg/L e alcalinidade entre 30 e 60 mg/L e quanto a amônia (NH₃), níveis entre 0,4-2,0 mg/l causam morte em poucos dias. (7). São omnívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos e possuem hábitos noturnos (46, 38).

Devido a sua prolificidade, robustez e bom ganho em peso, a espécie tem sido intensivamente pesquisada, tanto em pesquisa aplicada como alternativa de produção de peixes (11,92, 93) pois possui excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para pesca esportiva quanto para alimentação, com características propícias ao processamento (25), bem como em pesquisa básica como por exemplo a resposta ao estresse (13,15) possuindo ações muito semelhantes com outras famílias de peixes, podendo ser usado como um modelo de pesquisa para outros bagres em todo o mundo (56).

Por essas interessantes características zootécnicas e pela considerável quantidade de conhecimento é que a espécie foi escolhida como modelo para avaliar o potencial probiótico sobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse.

2.3 RESPOSTA ENDÓCRINA AO ESTRESSE

Durante a história de desenvolvimento do peixe, a exposição a agentes estressores é inevitável. Tal fato traz como consequência o comprometimento do equilíbrio homeostático do animal, que por sua vez, desencadeia um conjunto complexo de respostas adaptativas a fim tornar a restabelecer este equilíbrio. Essa resposta se denomina estresse, caso a intensidade do estressor persistir por um período prolongado, o mecanismo de resposta fisiológica pode ser comprometido causando problemas para a saúde do peixe. (16).

Ao ser exposto a um determinado estressor, a resposta fisiológica se inicia com a percepção da ameaça no sistema nervoso central (SNC). Impulsos são liberados por meio de nervos simpáticos os quais inervam as células cromafins (77), este tecido cromafim é homólogo a medula da glândula adrenal e está localizada na região anterior do rim em peixes teleósteos (2). Quando estimuladas estas células liberam catecolaminas a partir do estímulo de receptores colinérgicos, a catecolamina predominante é a adrenalina que por estar armazenada nestas células apresentam uma liberação rápida e seus níveis aumentam imediatamente com o estresse (77).

De forma mais lenta ocorre a liberação de corticosteróides a partir do eixo hipotálamo hipófise interrenal (HHI). Ao receber a informação, o hipotálamo no cérebro libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH), este por sua vez estimula as células corticotróficas da hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Ao cair na corrente sanguínea ocorrerá o estímulo das células interrenais (homólogo ao córtex da adrenal) que estão presentes no rim e estas por sua vez irão sintetizar e liberar os corticosteróides na circulação para que alcance seus tecidos alvos (18). O cortisol é considerado o principal corticosteróide em teleósteos, e possui função glicemiante, promovendo um aumento no aporte de energia disponível para que o peixe responda ao agente estressor (20). Por ser este um processo que leva vários minutos, é possível medir sua quantidade na corrente sanguínea e usá-lo como um indicador do grau de estresse em peixes (17). O controle da liberação de cortisol se dá por meio de *feedback* negativo em todos os níveis do eixo HHI. (20).

2.4 PROBIÓTICO

Devido ao grande potencial benéfico dos probióticos, estes têm sido foco de muitos estudos e pesquisadores vêm sugerindo ao longo dos anos alterações e complementações

referentes à definição e descrição de suas principais características, composição, modo de ação e efeitos produzidos no hospedeiro.

O uso de probióticos na nutrição de humanos (39) e animais(84)é bem documentadae a sua aplicação em aquicultura também tem sido uma realidade (98, 65).

Quando referido exclusivamente a organismos terrestres, probiótico pode ser definido como um suplemento alimentar com microorganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (39).

Diferente do ambiente terrestre, em aquicultura, a microbiota intestinal não existe como entidade por si só, mas é uma constante interação do ambiente com as funções dos hospedeiros, onde as bactérias presentes no meio aquático influenciam a composição da flora intestinal e vice-versa(98). Sendo que os gêneros presentes no trato intestinal em geral parecem ser os mesmos presentes no ambiente ou na dieta, os quais podem sobreviver e multiplicar no trato intestinal (24).

Além disso, quando comparados aos animais terrestres, os animais aquáticos sofrem uma influência maior de microorganismos, principalmente dos patogênicos, pois estes independem de hospedeiros e em determinadas circunstâncias podem atingir uma alta densidade sobre o animal. Essa interação com o hospedeiro ocorre na ingestão de alimentos e água, no contato com a superfície de ovos, no momento do nascimento das larvas, nas guelras, sobre a pele, entre outros. Uma vez que essa mesma interação também ocorre com os microorganismos probióticos, é possível definir probiótico em aquicultura como um adjuvante microbiano vivo que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, modificando sua comunidade microbiana ou do ambiente associado, assegurando uma melhor utilização do alimento ou melhorando seu valor nutricional, reforçando a resposta do hospedeiro à doença, ou melhorando a qualidade do ambiente que o envolve(98).

A maioria dos probióticos propostos como agentes de controle biológico em aquicultura pertencem às bactérias de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, espécies de *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, e *Saccharomyces*, embora outros gêneros ou espécies também foram mencionados (67, 65).

Para ser considerado um bom microorganismo probiótico, ele deve possuir algumas características importante como: exercer um efeito benéfico no hospedeiro; não ser patogênico e/ou tóxico; ter células viáveis presentes em quantidades adequadas; ser capaz de sobreviver e metabolizar no ambiente intestinal, por exemplo, resistindo ao baixo pH e à

ácidos orgânicos; e ser estável e capaz de permanecer viável por longos períodos sob condições de armazenamento e no organismo do animal hospedeiro (39; 49).

Ação de um determinado microorganismo *in vitro* pode não ser a mesma quando testada *in vivo*, portanto é necessário distinguir a capacidade da estirpe de influenciar o hospedeiro, da sua capacidade de atingir e manter-se no local em que o efeito probiótico será exercido (52).

Diversas formas de ação probiótica tem sido identificadas, dentre as quais se encontram: a produção de compostos inibidores, como a atividade antibacteriana (30), atividade antiviral (60) e atividade antifúngica (59); competição por sítios de adesão (97, 94); a modulação de respostas imunitárias do hospedeiro (79); competição por produtos químicos ou energia disponível (80); competição por nutrientes (40); melhoria da qualidade da água (54,09); interferência com quorum sensing (55); interação com fitoplâncton; e a contribuição para a digestão enzimática (98,65).

Portanto o uso de probióticos, pela sua variedade de mecanismos, é cada vez mais visto como uma alternativa para enfrentar alguns desafios na aquicultura, como a redução do estresse e a busca por melhor e mais rápido crescimento.

2.5 AÇÃO PROBIÓTICA NO ESTRESSE DE PEIXES

Diversos trabalhos tem demonstrado a ação e os benefícios do uso de probióticos no que se refere à resposta de peixes a agentes estressores, como a melhora da capacidade de enfrentamento de *Oreochromis niloticus* ao estresse de superlotação a partir do uso profilático de bactérias probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* (47); diminuição dos níveis de cortisol em robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, L., utilizando *L. delbrueckii delbrueckii* como probiótico (27); maior sobrevivência de *Catla catla* tratados com probiótico durante a embalagem e transporte (76), redução dos níveis de cortisol durante o transporte de *Paracheirodon axelrodi*, utilizando um probiótico multiespécie composto de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* (45) e a redução e expressão de HSP70 e de receptores de glicocorticoides em *Sparus aurata* utilizando o probiótico multiespécies, composto de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus* (4).

2.6 CONDIÇÕES PARA VIABILIZAR O DESENVOLVIMENTO DO PROBIÓTICO

Conhecidos como viabilizadores do desenvolvimento de probióticos, os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no intestino. (43)

Desta forma, quando determinado probiótico é administrado, geralmente com a interrupção do tratamento, as estirpes não são mantidas no intestino de forma dominante. Uma estratégia saudável para ajudar a microbiota probiótica a se manter de forma sustentável no intestino de peixes é a suplementação com prebióticos adequados, que servirão de alimento para as bactérias. (85).

As características de um bom prebiótico, incluem: Não ser hidrolisado, nem absorvido na parte superior do trato gastro-intestinal; Ser fermentado de forma seletiva por bactérias potencialmente benéficas no cólon; Alterar a composição da microbiota para uma composição mais saudável; e preferencialmente, induzir efeitos que são benéficos para a saúde do hospedeiro. (37)

Em meio aos prebióticos mais utilizados é possível citar os frutanos do tipo inulina e oligofrutose, derivados das raízes de chicória, β -glucano e arabinoxilanos presentes em cereais, o transgalacto-oligossacarídeos, lactulose, isomalto-oligossacarídeos, lactosacarose, oligossacarídeos de soja, gluco-oligossacarídeos e os xilooligossacarídeos ricos em carboidratos fermentáveis não digeríveis. Dentre estes, estudos apresentam como promissores em aquicultura o β -glucano, a inulina e oligofrutose, os quais aumentam significativamente *in vitro* o crescimento de estirpes probióticas. (85). Desta forma se observa a importância da escolha dos ingredientes utilizados na ração fornecida para peixes, os quais podem influenciar no desenvolvimento das cepas probióticas.

2.7 BACILLUS

As espécies de *Bacillus* são bactérias Gram-positivas em forma de haste, facultativamente anaeróbios ou aeróbios, formadoras de esporos. Muitas apresentam uma ampla capacidade fisiológica que lhes permitem viver em qualquer ambiente natural (96).

Espécies *Bacillus* são bactérias saprófitas, comuns no solo, água, poeira e ar (69), sendo consideradas alóctones, entrando no intestino através da comida (51).

Estas bactérias tem sido amplamente utilizadas como probiótico devido suas características de secretar muitas exoenzimas, e competir por espaço e nutrientes, deslocando bactérias não desejáveis, no intestino por exemplo, ou inibindo o crescimento de outras bactérias (66).

Alguns mecanismos de ação tem sido relatados com relação ao efeito benéfico exercido pelo gênero *Bacillus*, tais como a produção de proteases, capaz de melhorar o desempenho de crescimento do camarão através do aumento da digestibilidade de alimentos. (61); ação na exclusão competitiva, inibindo o crescimento de *Vibriocarchariae* em Jundiá (*Rhamdiaquelen*) (94) e conferindo maior resistência da Truta Arco-íris (*Oncorhynchusmykiss*) contra *Yersiniaruckeri*(75); Produção de nisina considerada como bacteriocina e molécula sinalisadora interferindo no quorumsensi (55); modulação fisiológica e imunológica como aumento na atividade oxidativa e bactericida do soro (58), aumento na conversão alimentar, e taxa de eficiência proteica em *Oncorhynchusmykiss* (5, 64), aumento de imunoglobulina, lisozima e atividade oxidativa em carpa (*Labeorohita*) (68); contribui para a melhora da qualidade da água como biorremediação (54, 66) e reduz os níveis de cortisol (45, 4).

Além disso, uma das principais vantagens de *Bacillus* sobre as bactérias ácido lácticas, na elaboração de probióticos, reside em sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal (50) e durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (44).

No presente estudo o foco foi o uso de um probióticomultiespécie formado por:

B. methylotrophicus: Estirpes de bactérias pertencentes a este classe são microrganismos associados a plantas conhecidas por ter efeitos benéficos no hospedeiro, como a promoção do crescimento e melhoria da saúde (41).É também uma potente bactéria de liquefação de amilase e produtora outras enzimas extracelulares de importância industrial (21).

B. cereus: Bactéria presente no solo, quem apresentado ação significativamente no percentual de sobrevivência e aumento da altura, largura e espessura das vilosidades intestinais em Tilápias-do-Nilo (62).

B. amyloliquefaciens: é responsável por grande parteda produção mundial de α -amilase e proteases(1) e possui ação antibiótica e antifúngica (99).

3. CAPÍTULO 1

Efeito de probiótico sobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Jundiá (*Rhamdia quelen*)

3.1 RESUMO

Melhorar a resposta ao estresse é um dos principais desafios na produção intensiva de pescado, pois o desequilíbrio fisiológico gerado, quando não restaurado, causa problemas no desempenho e na saúde do peixe. Como alternativa, uma formulação probiótica foi testada em duas espécies filogeneticamente distantes, Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o Jundiá (*Rhamdia quelen*) com o objetivo de avaliar o efeito sobre o desempenho zootécnico e a resposta ao estresse. Num primeiro momento quatro caixas de fibra de 1000 litros formaram o grupo controle, alimentados com ração sem probiótico, e quatro formaram o grupo tratado, alimentados com ração adicionada de probiótico. Durante o período de 84 dias (Jundiá) e 54 dias (Tilápias-do-Nilo) parâmetros zootécnicos foram avaliados. Numa segunda etapa os animais, tratados ou não, foram desafiados com estresse físico e amostras de sangue coletadas para determinar os níveis de cortisol. Desta forma, concluímos que o probiótico reduz o estresse em Tilápias-do-Nilo, mas não em Jundiás, e em ambas as espécies o probiótico não interfere no desempenho zootécnico.

Palavras chaves: Estresse, *Oreochromis niloticus*, *Rhamdia quelen*, probiótico, cortisol.

3.2 ABSTRACT

Improve the response to stress is a major challenge in the intensive fish production because physiological imbalance generated when unrestored, causes problems in the performance and health of the fish. Alternatively, a probiotic formulation was tested in two phylogenetically distant species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Jundia (*Rhamdia quelen*) in order to evaluate the effect on the performance and the stress response. At first four 1000 liter fiber boxes formed the control group fed diet without probiotic and four formed the group treated, fed feed with added probiotic. During the period of 84 days (Jundia) and 54 days (Tilapia) zootechnical parameters were evaluated. In a second step the animals, treated or not, were

challenged with physical stress and blood samples collected to determine cortisol levels. Thus, we conclude that the probiotic reduces stress in tilapia from the Nile, but not Jundias, and in both species probiotic does not interfere on the performance.

key words: Stress, *Oreochromis niloticus*, *Rhamdia quelen*, probiotic, cortisol.

3.3 INTRODUÇÃO

A produção aquícola tem sido responsável pela maior parte da produção de pescado no Brasil e no mundo, exigindo um aumento na produção intensiva, que por consequência traz consigo vários desafios (57). Dentre eles, estão os altos custos com ração, problemas na taxa de conversão alimentar e o inevitável estresse enfrentado pelos peixes durante o cultivo, resultante de várias práticas que incluem a manipulação, seleção, classificação, transporte, estocagem, mudanças ambientais abruptas, entre outros. (17)

Quando a intensidade de determinado estressor persiste, o mecanismo de resposta fisiológica pode ser comprometido causando problemas no desempenho e saúde do peixe (16). Esse nível de tensão causado pelo estresse agudo pode ser mensurado pela quantidade de cortisol no plasma de peixes (20).

À luz destas considerações, é necessário fornecer alternativas para a aquicultura que auxiliem o peixe na resposta aos desafios de estresse, e melhore seu desempenho zootécnico. Alguns estudos sugerem que probióticos bacterianos podem responder a essas exigências, uma vez que são adjuvantes microbianos vivos que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, modificando sua comunidade microbiana ou do ambiente associado, assegurando uma melhor utilização do alimento ou melhorando seu valor nutricional, reforçando a resposta do hospedeiro à doença, ou melhorando a qualidade do ambiente que o envolve (98). Autores tem demonstrado que fornecer probiótico para peixes melhora a taxa de crescimento e sobrevivência e reduz os níveis de cortisol, permitindo uma melhor resposta ao estresse (27,95).

Um dos candidatos para o uso como probiótico são as bactérias do gênero *Bacillus*, devido as suas características de secretar muitas exoenzimas, competir por espaço e nutrientes, deslocar bactérias não desejáveis no intestino, inibir o crescimento de outras bactérias (66), e também por sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior

sobrevivência durante o trânsito estomacal (50), e durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (44).

Portanto o objetivo deste estudo é avaliar o efeito de um probióticomultiespécies do gênero *Bacillus* no desempenho zootécnico, e na resposta ao estresse físico agudo em Jundiás (*Rhamdia quelen*) e Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de out/2015 a maio/2016, nas instalações da Universidade de Passo Fundo (UPF), Rio Grande do Sul, Brasil (28° 15'S / 52° 24'W, 687 m acima do nível do mar).

Um total de 1.760 peixes foram utilizados, sendo 960 machos e fêmeas da espécie Jundiá (*Rhamdia quelen*), obtidos no Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO) da UPF, com peso médio de $15,4 \pm 1,3$ g, numa densidade de 1,84 g/L e 800 Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), revertidas sexualmente, com peso médio de $2,49 \pm 0,66$ g numa densidade de 0,24 g/L, obtidas na Piscicultura Nossa Senhora Aparecida, na cidade de Ijuí-RS.

Os animais foram aclimatados em tanques de fibra de 1000L por um período prévio de 10 dias, alimentados *ad libitum*, duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h), com ração comercial extrusada de características isoenergéticas, isoproteicas e isolipídicas, 42% de proteína bruta, 3400 kcal/kg de energia digestível (Jundiá) e 46% de proteína bruta, 3600 kcal/kg de energia digestível (Tilápia-do-Nilo), em foto período natural, aeração por meio de soprador compressor de ar e renovação de água contínua a uma taxa de 6 L/min, com drenagem na parte inferior dos tanques.

Durante o período de aclimação e experimental foram realizadas análises dos parâmetros de qualidade de água como: oxigênio dissolvido (oxímetro digital YSI 550A), pH e condutividade elétrica (pHmetro digital solar SL 110), temperatura e parâmetros de amônia total, dureza e alcalinidade através de testes colorimétricos e titulação.

O estudo foi dividido em dois experimentos, o primeiro para avaliação no Jundiá e o segundo na Tilápia-do-Nilo, onde cada experimento se dividiu em duas fases, na primeira foi avaliado o efeito probiótico sobre os parâmetros zootécnicos (TABELA 1) e na segunda o efeito sobre a resposta ao estresse, nos mesmos animais da fase 1.

TABELA 1: Parâmetros zootécnicos avaliados, fórmula de obtenção e unidade de expressão dos dados.

Índice / parâmetro	Fórmula	Unidade
Taxa de sobrevivência	$(\text{peixes vivos no dia específico da coleta} / \text{peixes estocados}) \times 100$	%
Comprimento total e comprimento padrão	Medição direta com ictiômetro	cm
Peso total do lote	Soma dos pesos de todos os peixes	g
Peso médio	Média dos pesos de cada peixe	$g \pm SD$
Ganho diário	$(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{tempo em dias}$	g/dia
Ganho diário médio	Média dos ganhos diários	$g/dia \pm SD$
Coefficiente de variação do peso	$(\text{Desvio padrão} / \text{média}) \times 100$	%
Taxa específica de crescimento	$[(\log \text{ do peso final} - \log \text{ do peso inicial}) / \text{tempo em dias}] \times 100$	%/dia
Índice Hepatosomático	$(\text{massa do fígado} \times 100) / \text{massa corpórea}$	%

O probiótico testado foi fornecido pela empresa Biotrade, formado pelo *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus amyloliquefaciens*, inoculado na ração pela própria empresa em uma concentração de $7,5 \times 10^6$ ufc/g, a cada 14 dias, a fim de manter a quantidade padrão de bactérias na ração.

3.4.1 Delineamento experimental

3.4.1.1 Experimento1 - Avaliação do efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse em Jundiá (*Rhamdia quelen*)

3.4.1.1.1 Fase 1: Avaliação do efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico

Os peixes foram distribuídos em oito tanques (120 peixes por tanque) (FIGURA 2), quatro tanques formaram o grupo controle, os quais eram alimentados com ração original sem adição de probiótico, os outros quatro constituíram o grupo tratado, alimentados com ração

adicionada de probiótico, duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h), *ad libitum* durante um período de oitenta e quatro dias

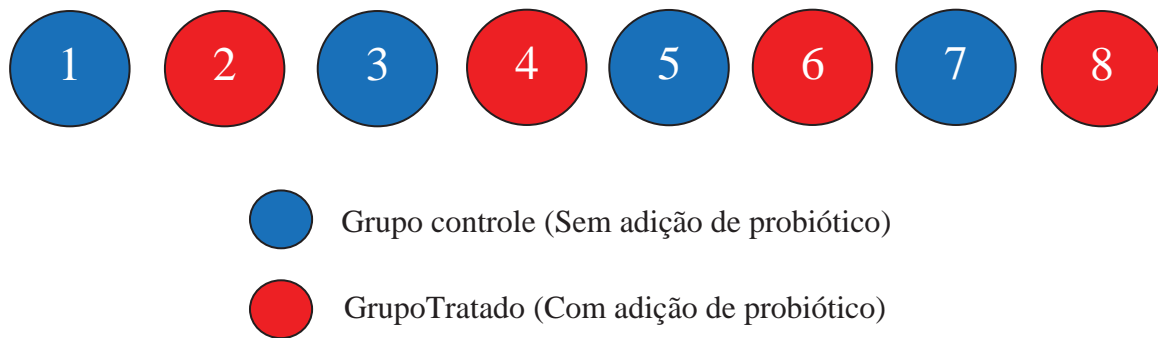


FIGURA 2. Disposição dos tratamentos na fase 1.

Em intervalos de quatorze dias, foram realizadas biometrias para avaliação zootécnica e o monitoramento dos parâmetros de qualidade da água, com exceção da condutividade elétrica, medida apenas no experimento 2. Uma amostra de vinte animais de cada caixa, eram capturados, anestesiados (MS222 Finquel[®] 300mg/L tamponado com 600 mg/L NaHCO₃), e após a perda de postura (grau de pressão 4 – Anestesia) se realizava a coleta de dados para avaliação zootécnica.

Oito desses animais eram abatidos por secção medular e dissecados para coleta de fígado, o qual era pesado, para avaliação do índice hepato-somático.

Encerrado a coleta de dados, os 12 animais restantes permaneciam em uma bacia com água sem anestésico, após passar a anestesia os animais eram devolvidos para seus respectivos tanques.

3.4.1.1.2 Fase 2: Avaliação do efeito probiótico na resposta ao estresse.

Das quatro caixas de cada grupo duas foram desafiadas com estresse agudo e duas não foram desafiadas (FIGURA 3). O estresse agudo consistiu na perseguição dos animais com puçá durante 60 segundos. Decorrido uma hora após a aplicação do estresse, amostras de sangue foram coletadas.

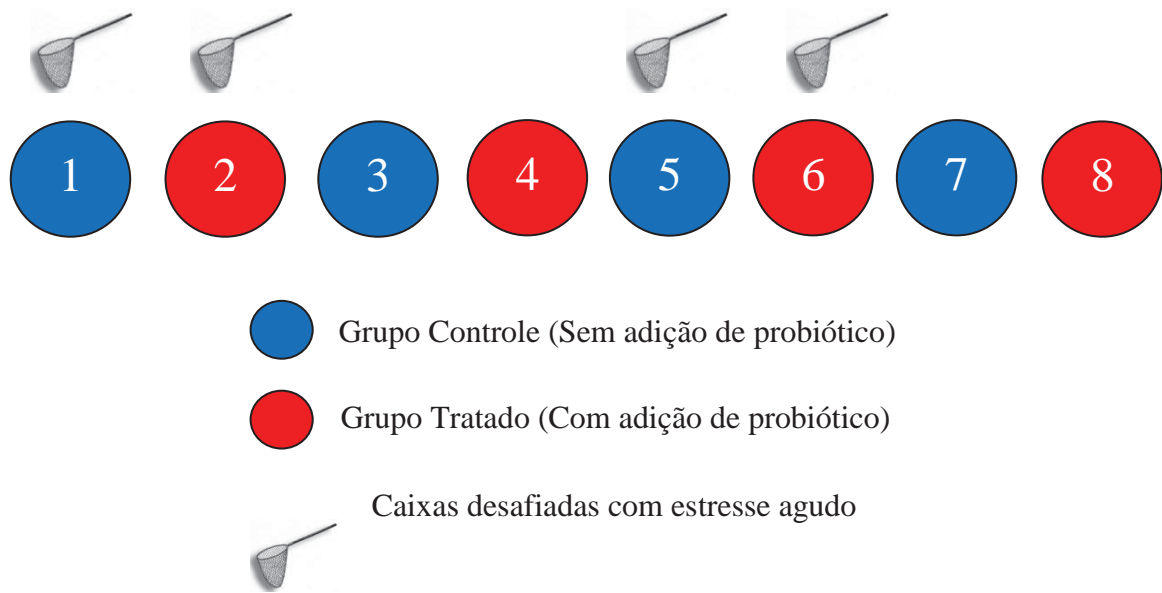


FIGURA 3. Disposição dos tratamentos na fase 2 referente ao experimento 1

Oito Jundiás de cada caixa foram capturados e anestesiados (MS222 Finquel[®] 300mg/L tamponado com 600 mg/L NaHCO₃), após a perda de postura, amostras de sangue foram coletadas pela secção do plexo caudal utilizando capilares heparinizados, os capilares foram colocados em tubos de ensaio e depois de centrifugado por 10min a 3000rpm o plasma foi separado em tubos plásticos tipo Eppendorf de 1,5 mL e congelado para posterior determinação das concentrações séricas de cortisol através de teste de ELISA, a partir de kits previamente validados para a espécie.

3.4.1.2 Experimento 2 - Avaliação do efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico e resposta ao estresse em Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

3.4.1.2.1 Fase 1: Avaliação do efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico

No estudo com Tilápias-do-Nilo foi utilizado o mesmodelineamento experimental descrito para Jundiás, exceto quanto ao período de duração do experimento que foi de 53 dias, o qual teve que ser abreviado devido ao início do período de frio. Cemeixes foram distribuídos em cada tanque e devido à quantidade reduzida de animais o índice hepatossomático não foi avaliado.

3.4.1.2.2 Fase 2: Avaliação do efeito probiótico na resposta ao estresse.

No 53º dia do experimento a temperatura ambiente caiu drasticamente pela proximidade do período de inverno, reduzindo a temperatura da água para 15,65°C (estressante para Tilápias-do-Nilo (28), mediante isso, se deu por encerrado a fase 1 do experimento e se iniciou a fase 2. A fim de dar prosseguimento, quatro caixas com capacidade para 100 L de água, aeradas e aquecidas artificialmente, com troca diária de 20% da água, foram preparadas para receber os peixes, duas caixas formaram o grupo controle, os quais continuaram a receber ração sem probiótico, sendo uma delas desafiada com estresse agudo e a outra não, e as outras duas caixas constituíram o grupo tratado com probiótico, onde uma sofreu estresse e a outra não.

Tanto o grupo tratado como o grupo controle foi formado a partir dos tanques do experimento um, oito animais de cada tanque foram utilizados para formar os novos grupos contendo dezesseis animais (FIGURA 4).

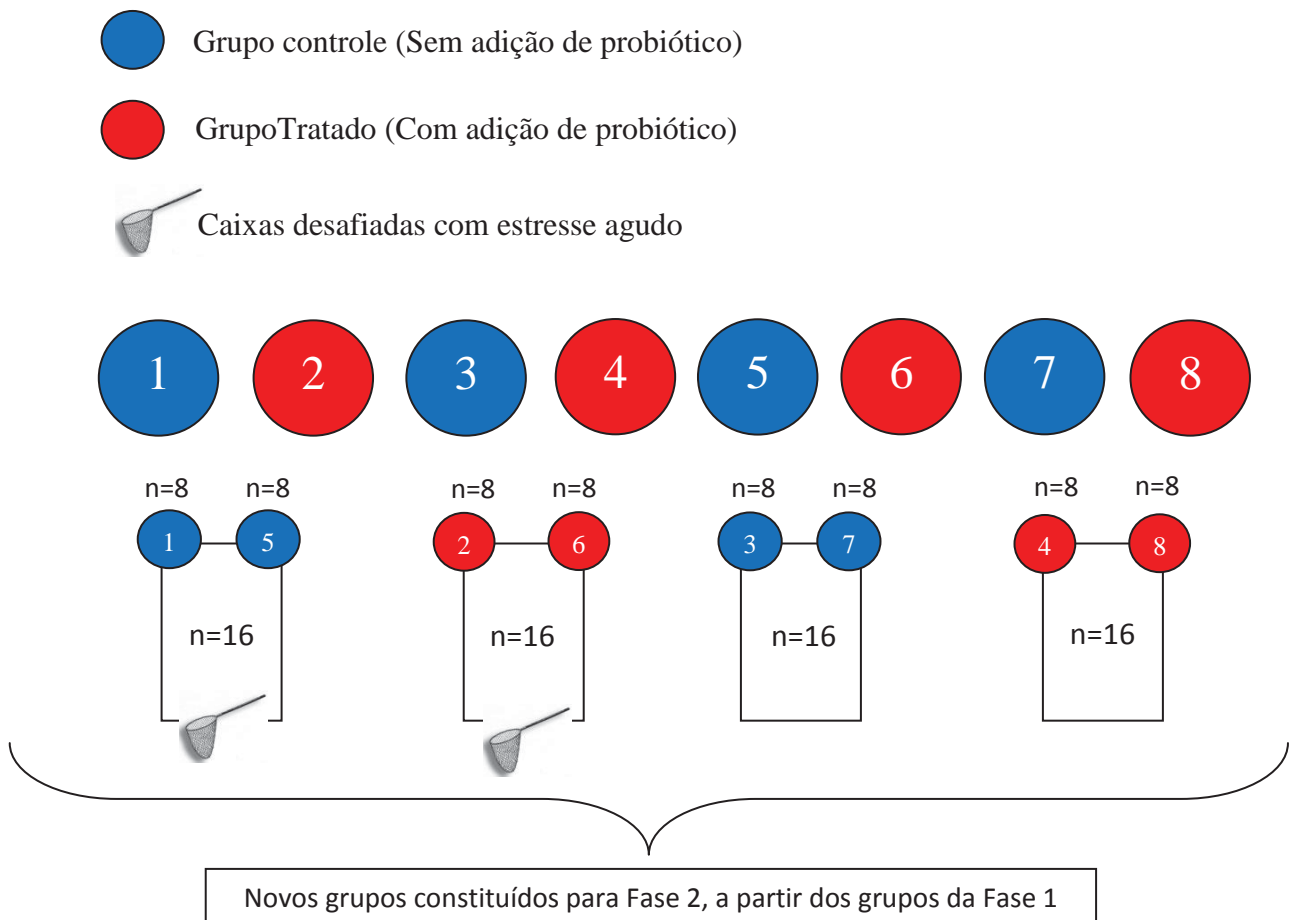


FIGURA 4. Disposição dos tratamentos na fase 2 referente ao experimento com Tilápias-do-Nilo.

Durante sete dias os peixes permaneceram nas novas estruturas com a finalidade de adaptação, e diariamente parâmetros de qualidade da água foram avaliados.

Terminado o período de adaptação, os métodos descritos para o Jundiá foram aplicados, com exceção do estressor, que neste caso foi a manutenção dos animais fora da água durante 120 segundos.

3.4.2 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas a partir do pacote estatístico GraphPadPrism 6. As médias de cortisol foram comparadas por ANOVA de duas vias sendo o Probiótico (PROB) e o Estresse como fatores independentes. A mesma análise foi aplicada para os dados de qualidade de água e de coeficientes de variação, mas com o tempo (dia) e presença do probiótico como fatores independentes.

Para avaliação dos dados zootécnicos quando há comparação (PROB+X PROB-) foi utilizado o Teste T de Student. Quando comparada as caixas em cada unidade experimental foi utilizado ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A homocedastidade e a normalidade dos dados foram previamente verificadas pelos testes de Brown-Forsythe e Bartlett respectivamente.

3.4.3 Nota ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil (Protocolo 018/2016-CEUA).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Experimento Com Jundiás (*Rhamdia Quelen*)

3.5.1.1 Desempenho zootécnico

3.5.1.1.1 Peso

Aqui observamos (FIGURAS 5,6 e 7) que os animais do grupo tratado iniciaram significativamente maiores, o que provavelmente está relacionado a efeito de amostragem, essa diferença se manteve na segunda biometria, e com o passar do tempo ela foi perdida havendo um aumento gradual na variação onde o grupo controle apresentou mais momentos

no Coeficiente de Variação (Figura 7 (B)). Ambos os grupos terminaram o período com o mesmo peso médio.

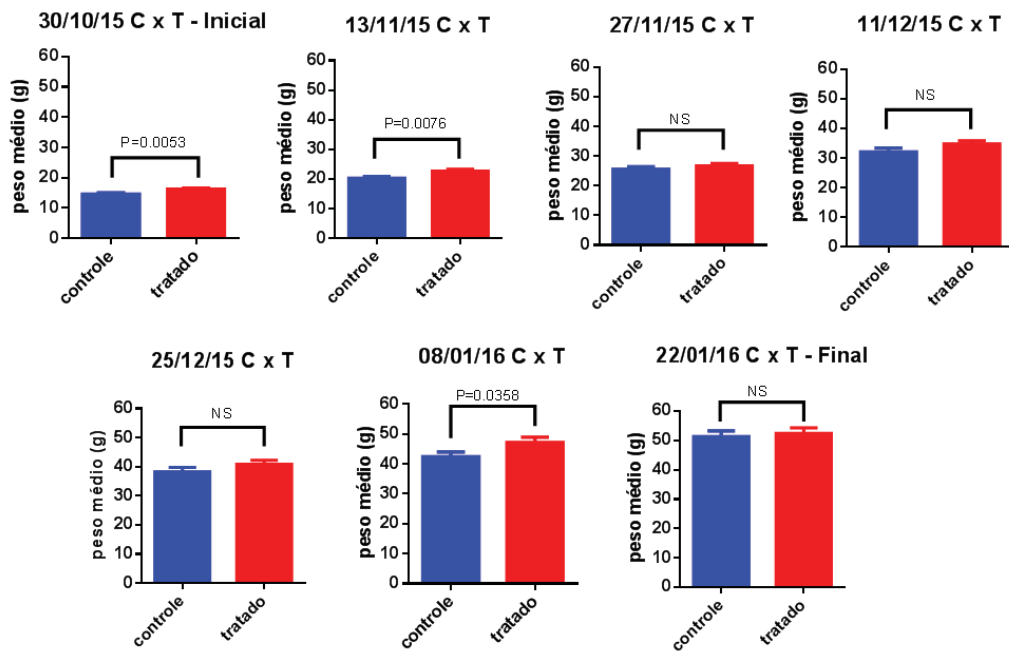


FIGURA 5. Peso médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. O valor de P indica o nível de significância enquanto NS indica que não houve diferença.

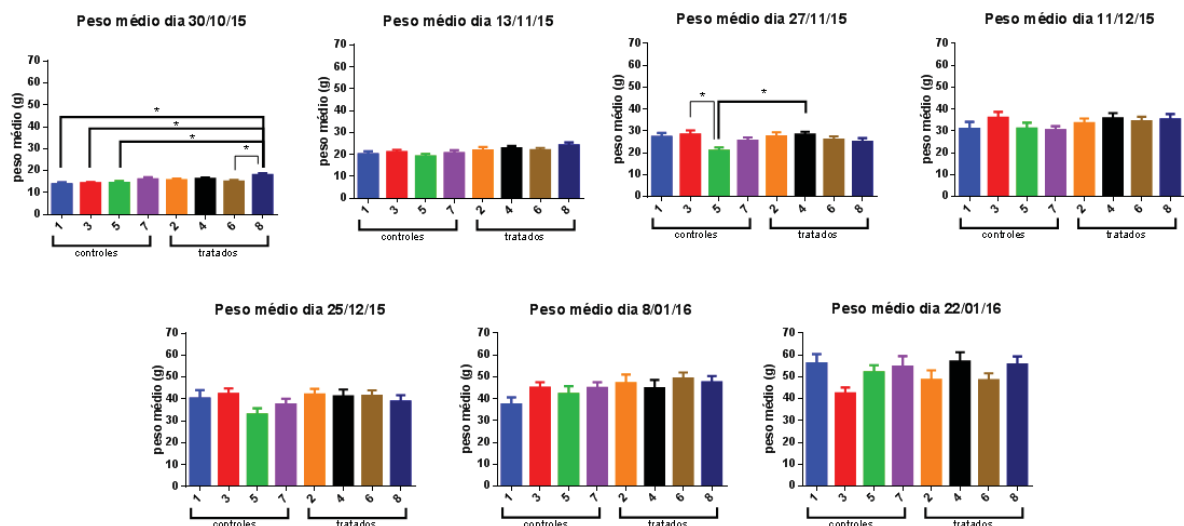


FIGURA 6. Peso médio dos peixes de cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.

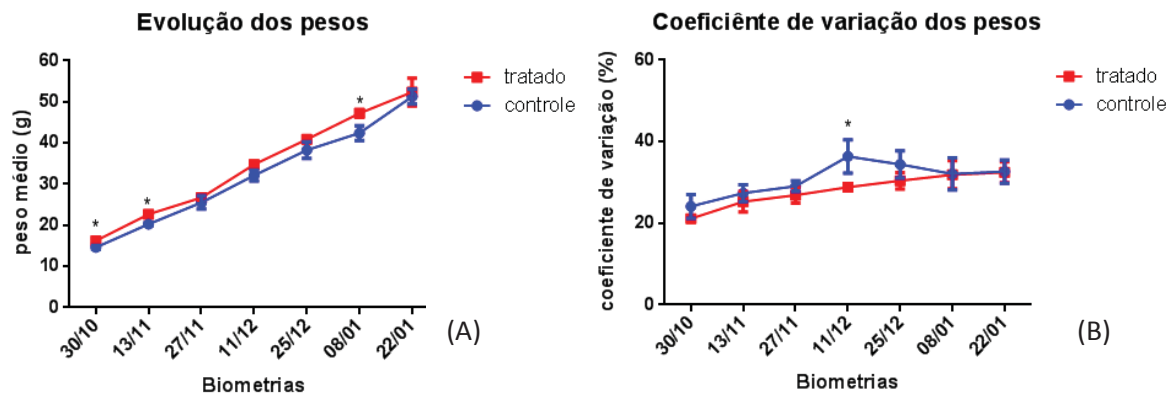


FIGURA 7. Evolução dos pesos (A) e coeficiente de variação dos pesos médios dos peixes nas diferentes condições (B). Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias. Os asteriscos indicam diferença estatística.

3.5.1.1.2 Comprimento padrão

Observamos que os peixes do grupo tratado iniciaram maiores (FIGURA 8 e 9 e 10) e mais pesados (FIGURA 7 (A)) do que os controles, relacionado provavelmente ao efeito de amostragem. Por apresentarem maior uniformidade nos dias iniciais, existe um baixo desvio padrão, ficando mais fácil que a estatística detecte diferenças significativas, como a variação cresceu gradativamente, essa diferença foi perdida, sendo essas diferenças iniciais irrelevantes.

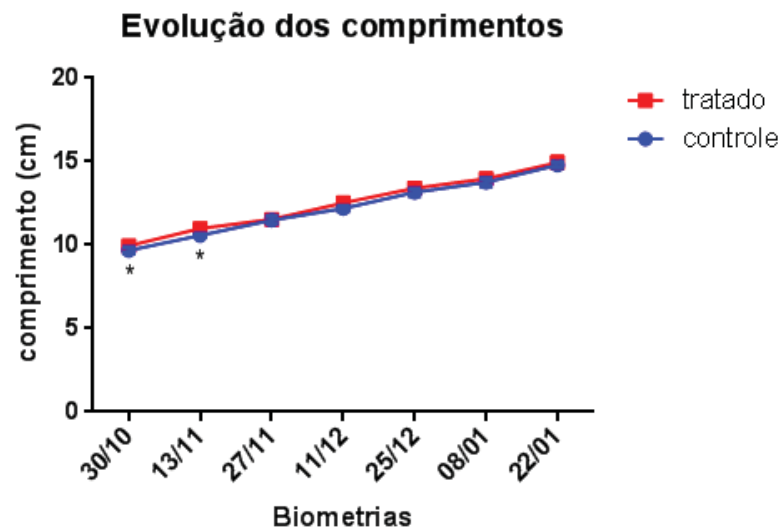


FIGURA 8. Evolução dos comprimentos. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias. Os asteriscos indicam diferença estatística.

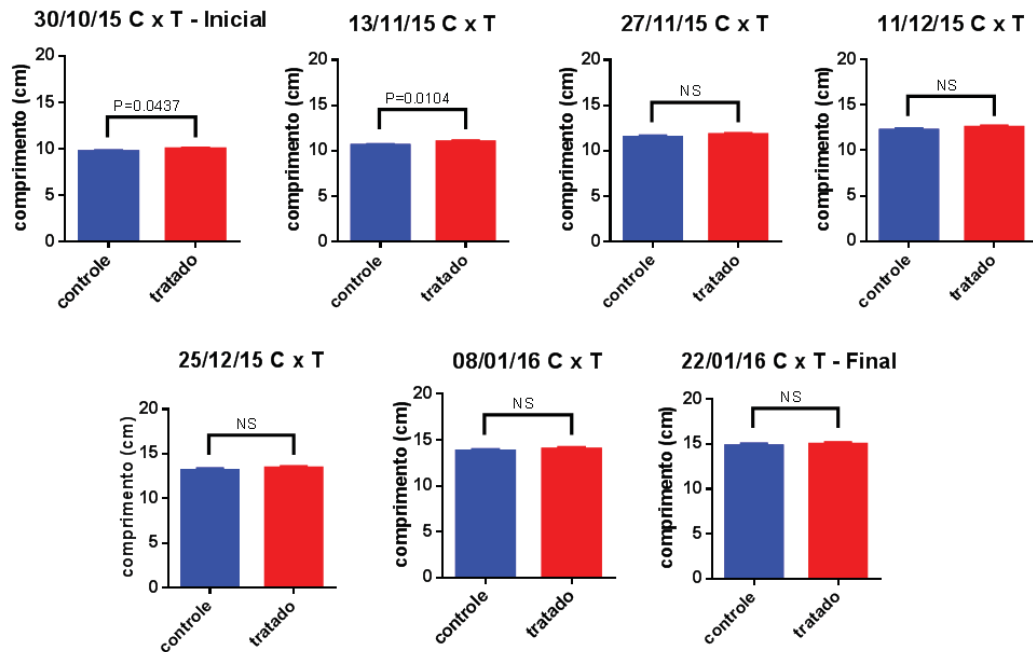


FIGURA 9. Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. O valor de P indica o nível de significância enquanto NS indica que não houve diferença.

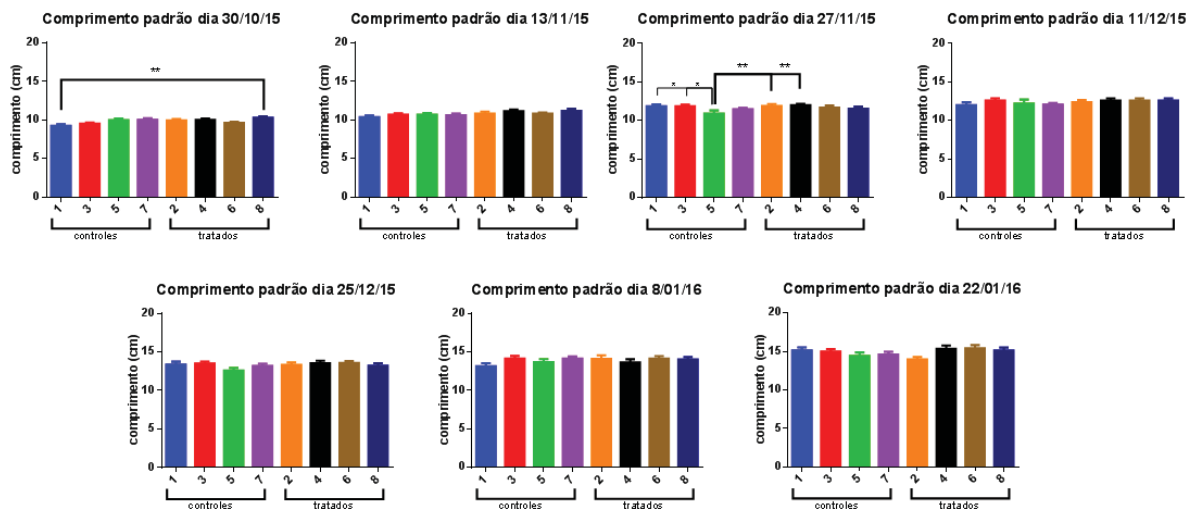


FIGURA 10. Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.

3.5.1.1.3 Ganho médio por dia

Se observa um Coeficiente de Variação muito alto (FIGURA 11), dificultando a possibilidade de diferenças.

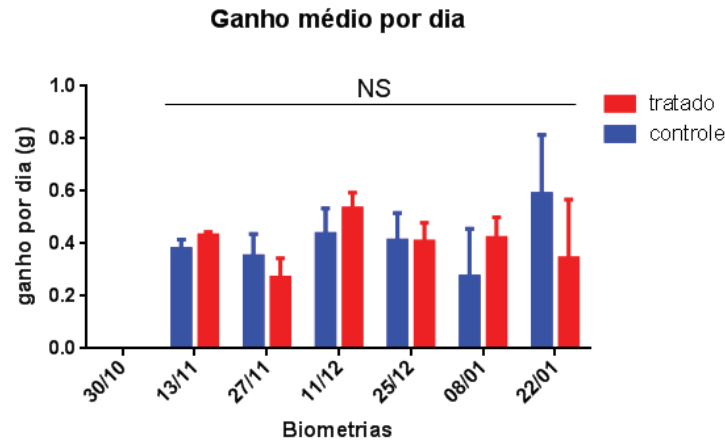


FIGURA 11. Ganho em peso por dia dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.

3.5.1.1.4 Taxa específica de crescimento

Percebemos que a taxa específica de crescimento (FIGURA 12) não mostrou nenhum efeito do tratamento, uma vez que houve similaridade para todos os grupos.

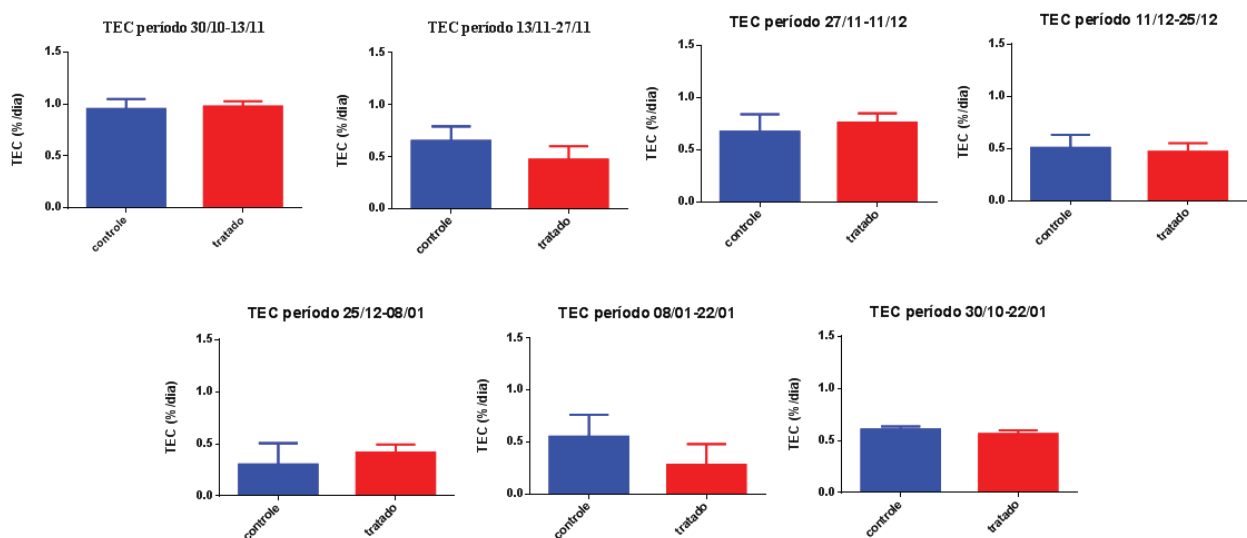


FIGURA 12. Taxa específica de crescimento dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.

3.5.1.1.5 Biomassa Final

Os dados (FIGURA 13) apontam claramente para a ausência de efeito do tratamento. Os controles apresentaram variações maiores na biomassa e menor no peso médio final. Mas

isso não se traduziu em diferenças significativas entre as médias nos três parâmetros. Quanto à sobrevivência não houve diferenças significativas.

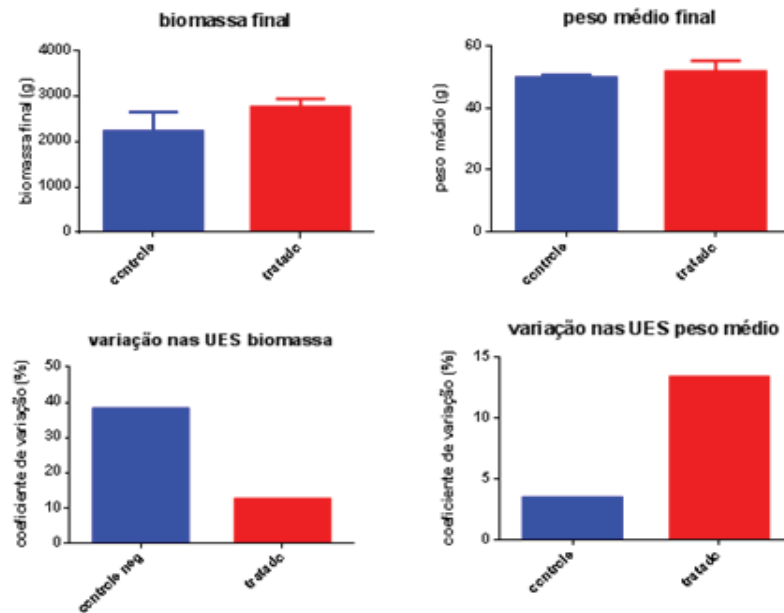


FIGURA 13. Biomassa final, taxa de sobrevivência e peso médio final dos peixes nas diferentes situações e seus respectivos coeficientes de variação. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.

3.5.1.1.6 Índice Hepato-Somático

A princípio os efeitos de desempenho não podem ser explicados por qualquer questão hepática (FIGURA 14, 15 e 16), neste caso não houve nenhuma diferença entre tratamentos em cada biometria.

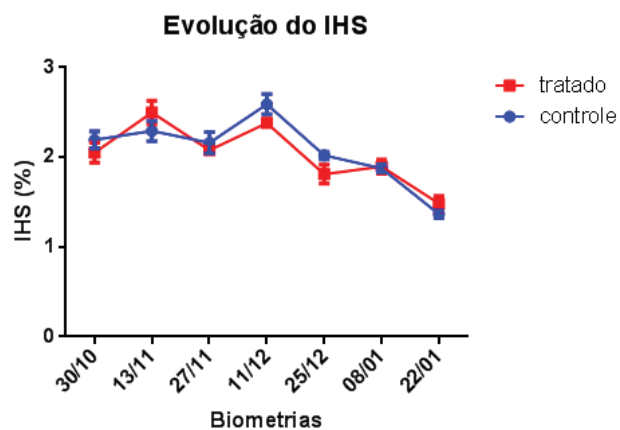


FIGURA 14. Evolução do IHS no período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias

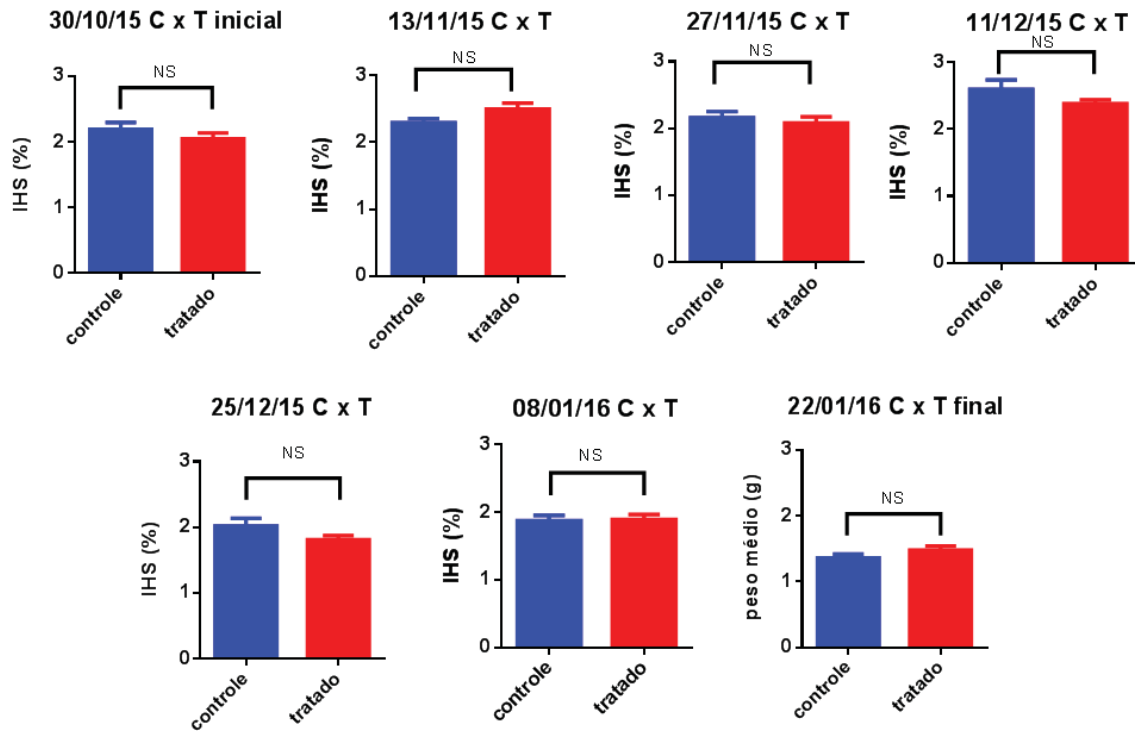


FIGURA 15. Índice hepato-somático (IHS) médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.

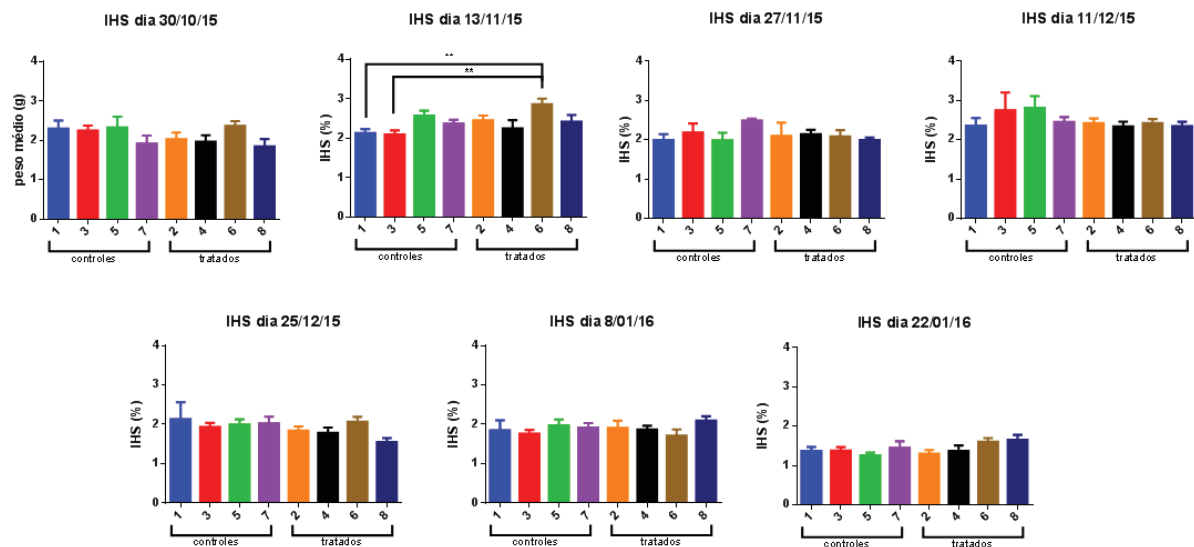


FIGURA 16. Índice hepato-somático (IHS) médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.

3.5.1.1.7 Parâmetros de qualidade de água

Observamos que ambos os grupos permaneceram todo o período experimental com níveis inadequados de oxigênio dissolvido $3,83 \pm 0,80$ (mínimo aceitável é 5 mg/L) e que permaneceram no limite inferior da faixa de pH ideal $5,98 \pm 0,15$ (ideal 6-8). A temperatura, dureza e alcalinidade se mantiveram na média de $23,94 \pm 0,95$; $29,58 \pm 3,54$; e $41,87 \pm 13,15$ respectivamente. Não houve diferença significativa nos parâmetros de qualidade de água e não foram detectados níveis de amônia.

3.5.1.2 Cortisol

Não foi detectada interação entre PROB e ESTRESE ($P = 0,9030$, $F_{1,53} = 0,01501$) nem tampouco efeitos isolados do PROB ($P = 0,6045$, $F_{1,53} = 0,2715$) e do ESTRESSE ($P = 0,0242$, $F_{1,53} = 0,5385$) (FIGURA 17). Os valores dos grupos controles se apresentam elevados, indicando estresse em todo sistema.

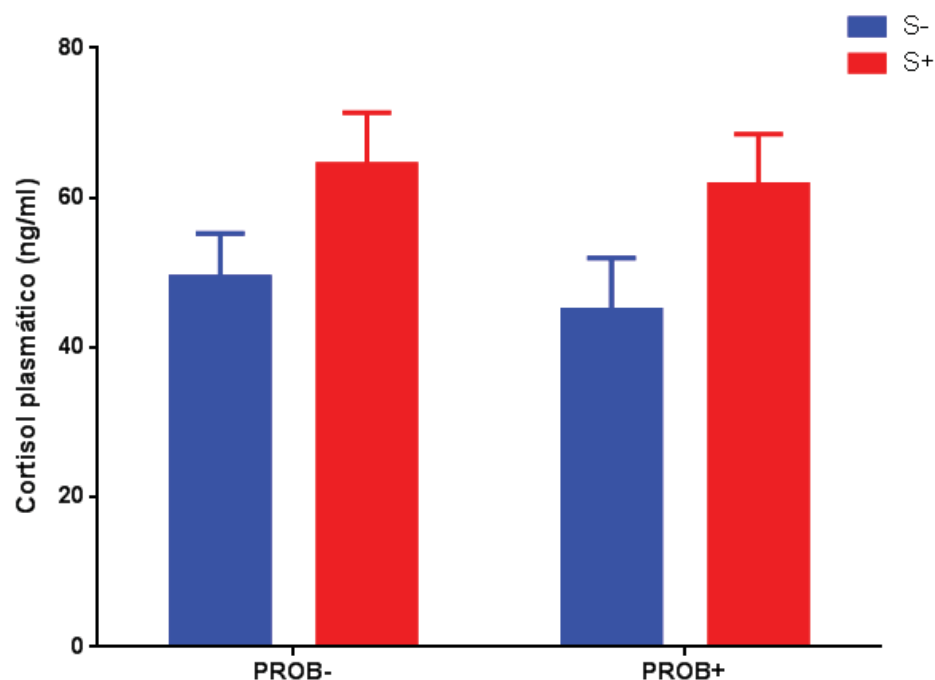


FIGURA 17. Concentrações de cortisol plasmático em Jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidas ou não ao estresse agudo, obtidas 1 hora após estresse. S-: Grupos não estressados; S+: Grupos estressados; PROB-: Grupos alimentados com ração sem adição de probiótico; PROB+: Grupos alimentados com ração contendo probiótico. Médias comparadas por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (valores de P e F no texto).

3.5.2 Experimento Com Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis Niloticus*)

3.5.2.1 Desempenho Zootécnico

3.5.2.1.1 Peso

Não houve grandes variações (FIGURAS 18, 19 e 20) entre os tratamentos, e ambos chegaram ao final do período com o mesmo peso sem diferenças significativas.

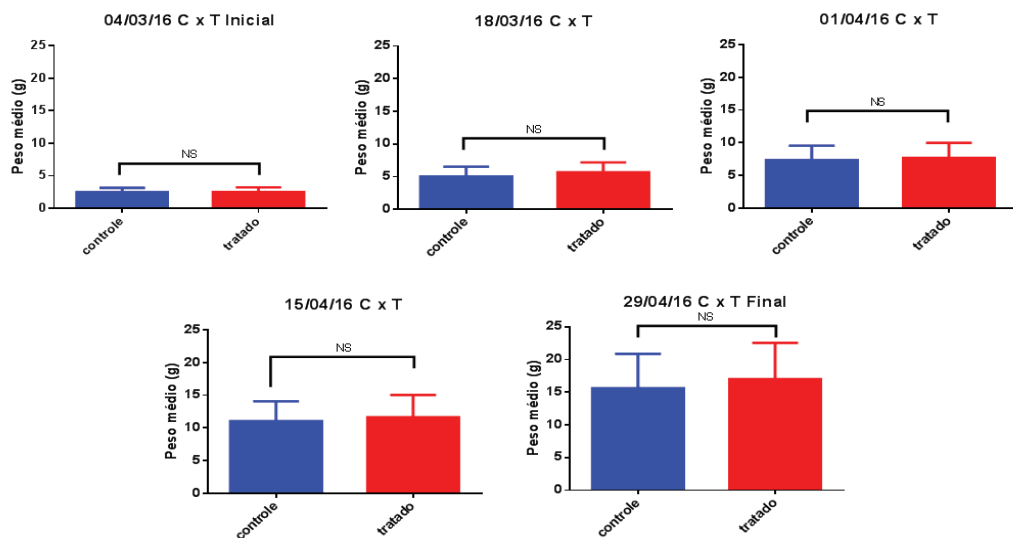


FIGURA 18. Peso médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria e em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.

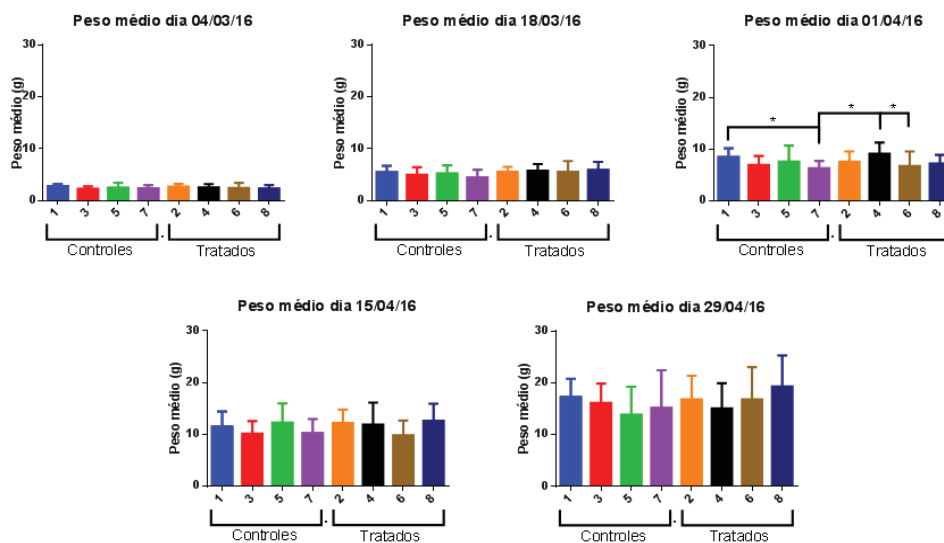


FIGURA 19. Peso médio dos peixes de cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.

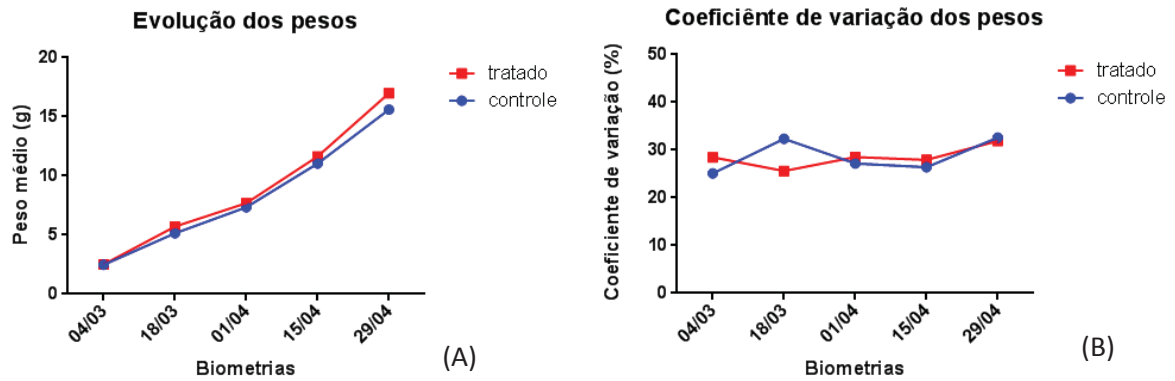


FIGURA 20. Evolução dos pesos (A) e coeficiente de variação dos pesos médios (B) dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias

3.5.2.1.2 Comprimento Padrão

Não foi observado diferenças em relação ao comprimento padrão dos animais (FIGURA 21, 22 e 23).

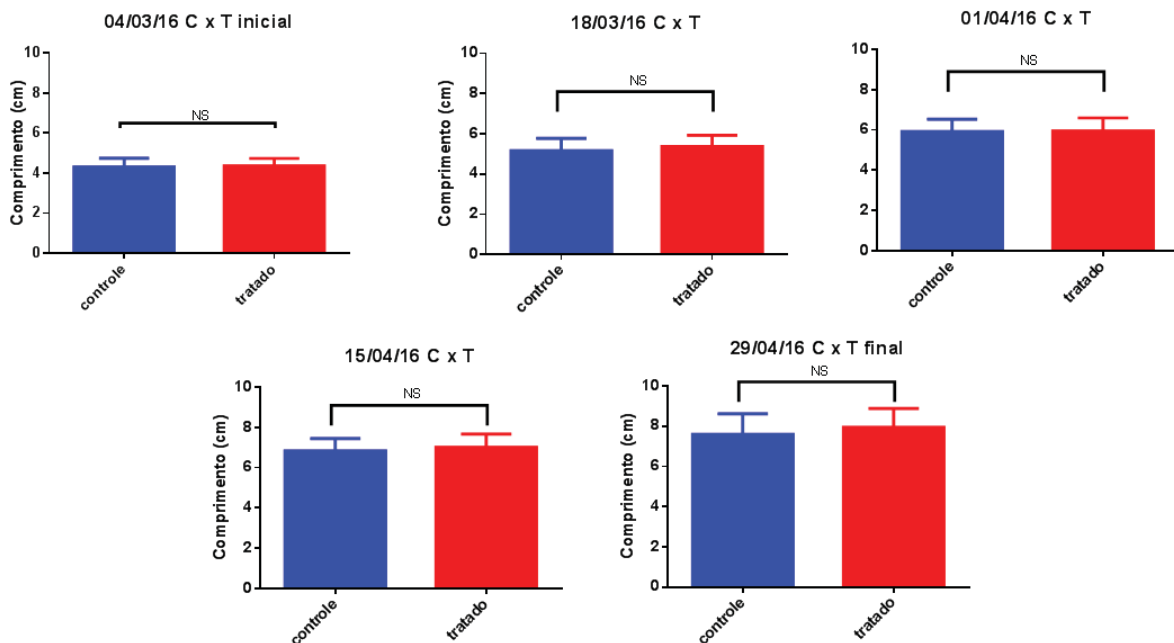


FIGURA 21. Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria em todo o período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student. NS indica que não houve diferença.

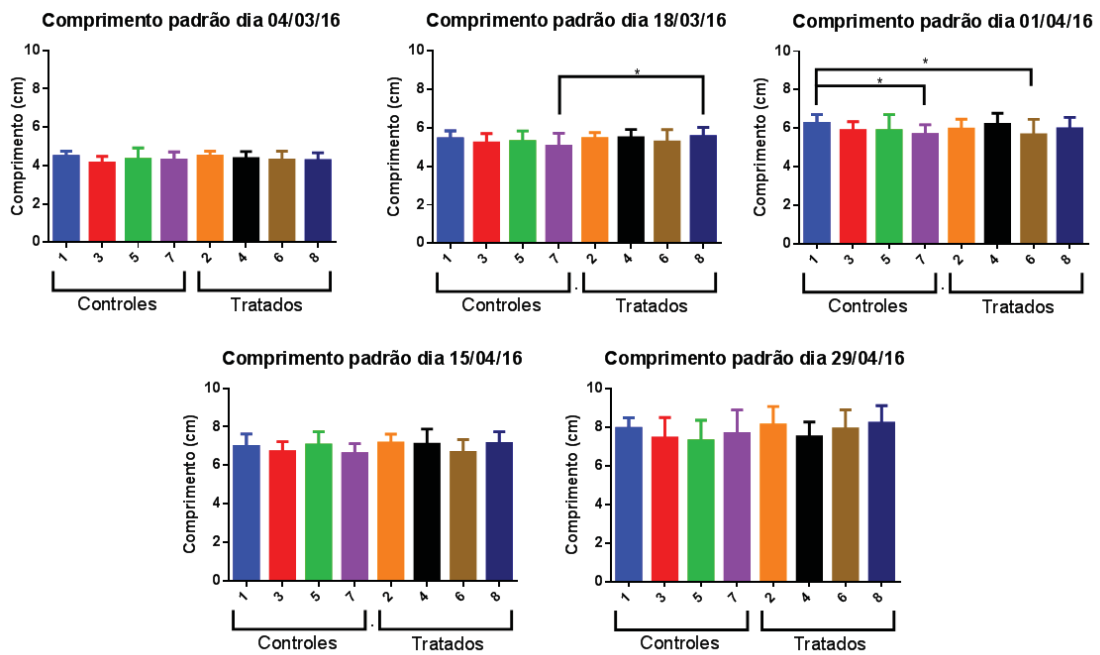


FIGURA 22. Comprimento padrão médio dos peixes por tratamento em cada dia de biometria em cada unidade experimental. Dados expressos em média \pm DP e comparados por ANOVA de uma via. Os asteriscos indicam diferença estatística.

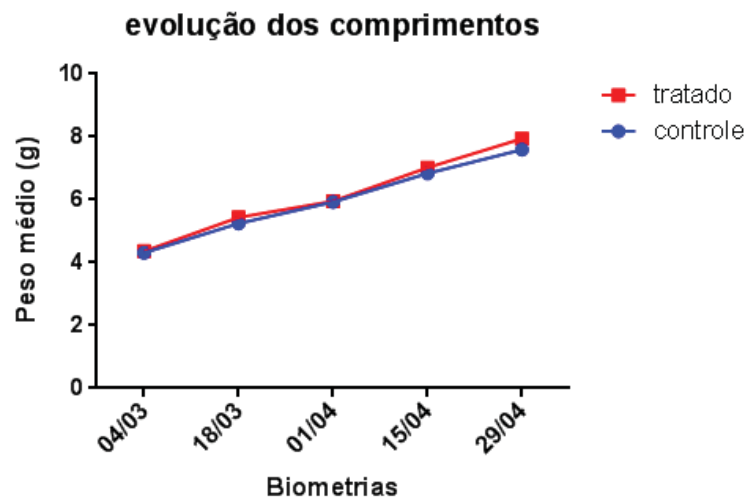


FIGURA 23. Evolução dos comprimentos no período. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados por ANOVA de duas vias

3.5.2.1.3 Ganho por dia

É possível observar (FIGURA 24) que os peixes tratados com probiótico obtiveram um ganho inicial de peso por dia significativamente maior no primeiro período, no entanto, essa diferença não se manteve.

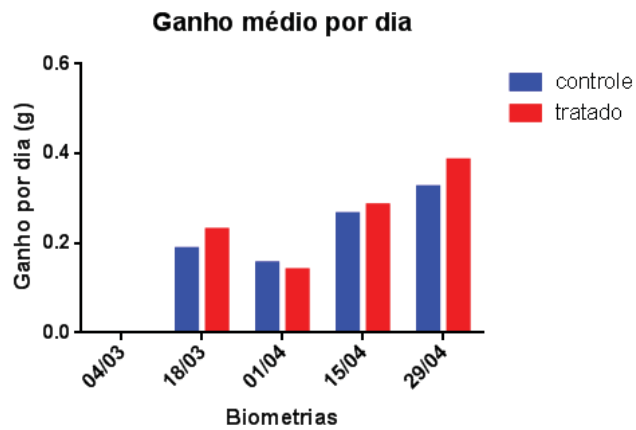


FIGURA 24. Ganho em peso por dia dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.

3.5.2.1.4 Taxa específica de crescimento

Não se observa diferenças significativas (FIGURA 25)

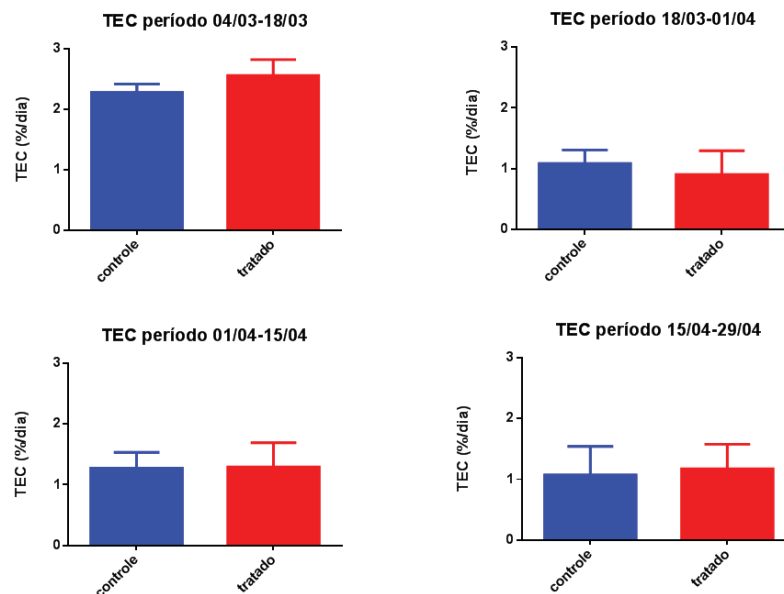


FIGURA 25. Taxa específica de crescimento dos peixes nas diferentes condições. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.

3.5.2.1.5 Biomassa Final

Os dados (FIGURA 26) apontam claramente para a ausência de efeito do tratamento. Os controles apresentaram variações maiores no peso médio final e menor na biomassa. Mas

isso não se traduziu em diferenças significativas entre as médias nos três parâmetros. Quanto à sobrevivência não houve diferenças significativas.

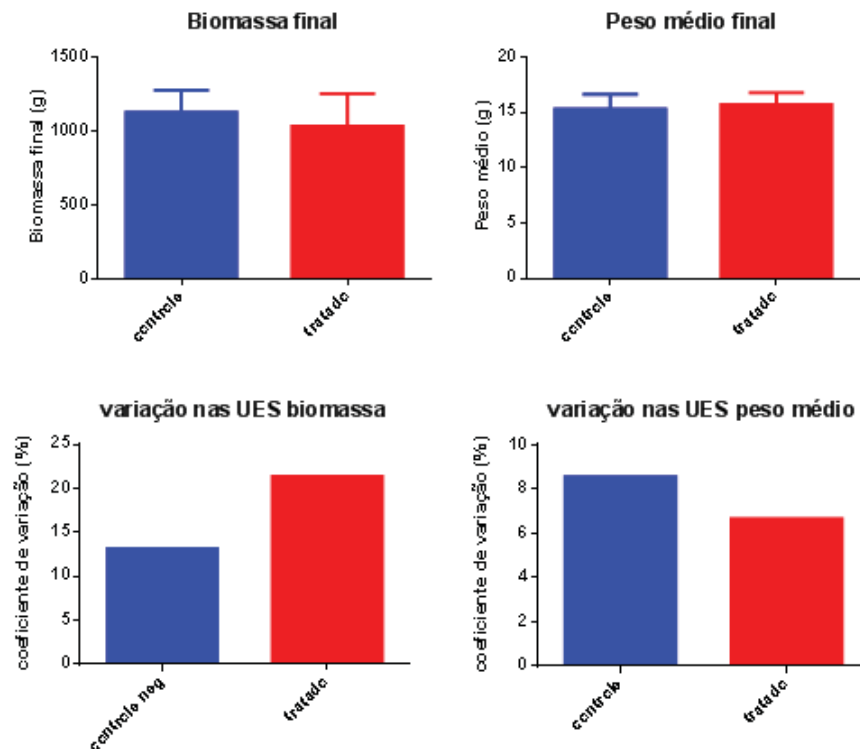


FIGURA 26. Biomassa final, taxa de sobrevivência e peso médio final dos peixes nas diferentes situações e seus respectivos coeficientes de variação. Dados expressos em média \pm D.P. e comparados pelo teste T de Student.

3.5.2.1.6 Parâmetros de qualidade da água

O pH $6,02 \pm 0,18$ e a temperatura $23,58 \pm 0,79$ °C se mantiveram a baixo do ideal para a espécie e no último período houve uma queda brusca na temperatura para $15,32 \pm 0,90$ °C. Os níveis de oxigênio, dureza, alcalinidade e condutividade elétrica se mantiveram na média de $6,53 \pm 0,71$; $33 \pm 5,16$; $33,25 \pm 5,72$ e $55,6 \pm 9,1$ respectivamente. Não houve diferença significativa nos parâmetros de qualidade de água e não foram detectados níveis de amônia.

3.5.2.2 Cortisol

Tilápias-do-Nilo alimentadas com ração contendo probiótico (PROB+) não elevaram cortisol quando desafiadas a um estresse agudo, o que ocorreu marcadamente nos peixes com

ração não contendo o probiótico (PROB-) (FIGURA 27). Não foi detectada interação entre a presença do probiótico e o estresse ($P = 0,2762, F_{1,30} = 1,230$) e sim efeito do probiótico ($P < 0,0001, F_{1,30} = 27,03$).

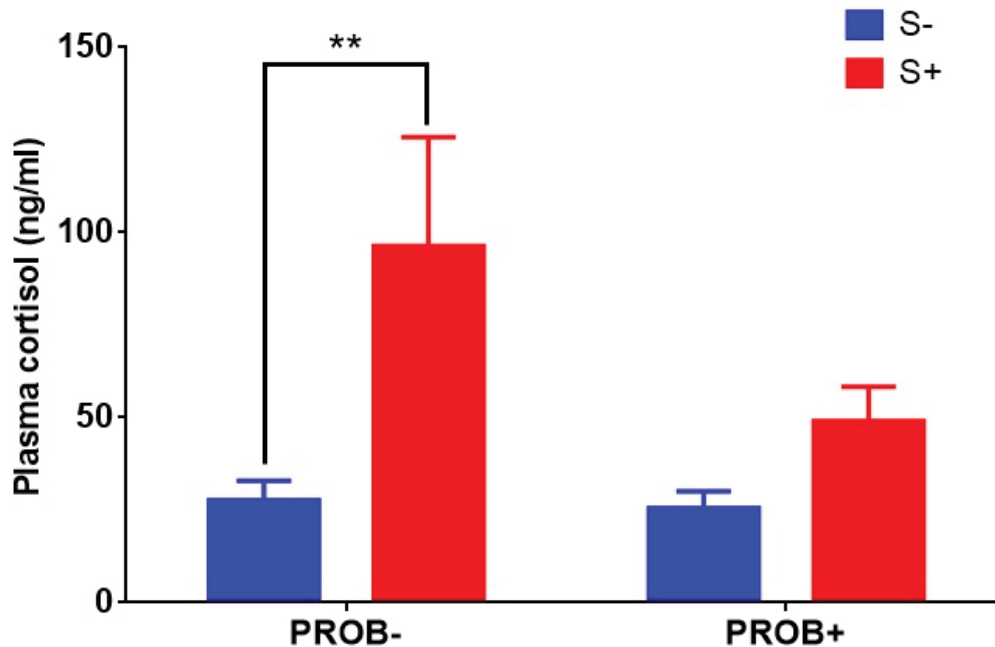


FIGURA 27. Concentrações de cortisol plasmático em Tilápias-do-Nilo submetidas ou não ao estresse agudo, obtidas 1 hora após estresse. S-: Grupos não estressados; S+: Grupos estressados; PROB-: Grupos alimentados com ração sem adição de probiótico; PROB+: Grupos alimentados com ração contendo probiótico; Os asteriscos indicam diferença entre os grupos. Médias comparadas por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (valores de P e F no texto).

3.6 DISCUSSÃO

O avanço da produção de pescados em cativeiro no Brasil e no mundo, o potencial de expansão, e a necessidade de adequação das práticas e estruturas para maior eficiência na produção (57), traz como consequência a inevitável exposição dos organismos a agentes estressores, que se tiverem seus mecanismos de defesas comprometidos, podem sofrer problemas na saúde e no desenvolvimento (16).

Como alternativa para redução do estresse e melhoria no desempenho zootécnico de peixes, se tem sugerido o uso de probióticos bacterianos (27, 95).

Aqui demonstramos que o probiótico conjugado do gênero *Bacillus* para duas espécies filogeneticamente distantes, o Jundiá (*Rhamdiaquelem*) de hábitos noturnos e a

Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) de hábitos diurnos, reduz o estresse em Tilápias-do-Nilo, mas não no Jundiá, e em ambos não afeta o desempenho zootécnico.

Duas hipóteses podem estar relacionadas à redução em Tilápias-do-Nilo, uma positiva, referente ao aumento da disponibilidade de energia para suporte metabólico (47) reestabelecendo a homeostase, e outra negativa, pela possibilidade do bloqueio ou exaustão do eixo HHI (12).

O gênero *Bacillus* produz proteases e outras enzimas capazes de melhorar a digestão e absorção de nutrientes (42, 100, 61), inibe o crescimento de microorganismos oportunistas na microflora intestinal por exclusão competitiva (97, 94), confere resistência contra microorganismos (75) e reduz o estresse (45, 4).

A capacidade de facilitar a digestão e absorção de nutrientes pode disponibilizar maior energia para a resposta ao estresse. Entretanto, não se observa efeito no desempenho zootécnico, tal fato pode ser explicado pela metodologia adotada, a cada catorze dias biometrias eram realizadas e os animais perseguidos e capturados, tal prática é considerada estressante para os peixes (15), que devido ao estresse não se alimentavam por determinado período. Assim, ocorrem alterações na flora intestinal, pois o estresse provoca degeneração de mucosa do intestino, perturbação do mecanismo de absorção e disfunção de barreira intestinal (88,89,91), diminui o apetite e o crescimento (82), reduzindo a microbiota intestinal aderente (83). Portanto, se em cada biometria havia prejuízo na flora intestinal, é possível que a quantidade de bactérias probióticas colonizando o intestino seja suficiente para reduzir o estresse, porém, não para interferir no desempenho zootécnico.

Tais argumentos também podem ser aplicados ao Jundiá, no entanto, a falta de efeito na resposta ao estresse podem envolver outros fatores.

Testes não publicados, realizados em larvas de Tilápia, utilizando o mesmo probiótico, mostram diferenças significativas no desempenho zootécnico. Esse efeito pode existir, uma vez que é preferível fornecer probióticos para peixes na fase larvar, pois é neste estágio ontogenético inicial que elas são liberadas no ambiente externo (19), e onde ocorre a formação da flora intestinal, facilitando a fixação e colonização do intestino pelas cepas probióticas (81).

A hipótese para um possível bloqueio ou exaustão no eixo HHI, pode ser considerada. No entanto, quando observamos ausência de diferença na taxa de sobrevivência e nos demais índices zootécnicos, que no caso de bloqueio apresentariam alterações negativas (16), podemos afirmar que tal bloqueio ou exaustão no eixo HHI não existe,

apoiando a hipótese de uma ação benéfica do probiótico na redução do estresse, tal fato também pode ser aplicado ao Jundiá.

Na espécie Jundiá, o probiótico não exerce efeito sobre a resposta ao estresse, apresenta níveis de cortisol elevados nos grupos controles indicando estresse em todo sistema. Apesar disso, por não possuir efeito positivo, nem negativo, podemos considerá-lo como não estressante para a espécie.

Tais resultados podem ter relação à fase de desenvolvimento dos animais, falhas no manejo e instalações, à qualidade da água e a características da espécie.

Quando desafiados ao estresse, os jundiás em fase juvenil se encontravam na puberdade, considerada como evento-chave no desenvolvimento e modulação do eixo HPI, exibindo uma resposta ao estresse mais prolongada em comparação com peixes adultos (14). Somado ao fato de que Jundiás juvenis apresentam seu pico de liberação 5 a 30 minutos após o desafio ao estresse (56), tendo seus níveis em 60 minutos muito próximos ao encontrado por nós, essa pode ser uma hipótese para os baixos níveis de cortisol nos grupos estressados. Já que a diferença entre os grupos controle VS estressados só pode ser observada com a medição durante o pico de concentração de cortisol, não é possível afirmar definitivamente que o probiótico não possui efeito sobre a resposta ao estresse em Jundiá, pois as amostras de sangue foram coletadas 1 hora após o estresse agudo (13, 15). Assim, nova repetição é necessária, observando a faixa de desenvolvimento do Jundiá e seu respectivo pico de liberação de cortisol.

O cortisol elevado nos grupos controle pode estar relacionado a possíveis problemas de manejo e instalações, ou ao estresse causado pelos níveis de oxigênio que se mantiveram na média de $(3,83 \pm 0,81)$, abaixo dos níveis aceitáveis (5 mg/L) e pH $(5,99 \pm 1,09)$ considerado como limite inferior da faixa de pH ideal (6-8).

Características referentes à domesticação da espécie também são importantes, de um lado temos a Tilápia-do-Nilo, espécie dócil, domesticada a mais de 30 anos no mundo, e a mais de 20 anos no Brasil, adaptada à criação em cativeiro (101) e alvo de intenso melhoramento genético (31). Por outro lado o Jundiá, espécie pouco conhecida cientificamente (26), rústica e com menor período de domesticação e adaptação à criação em cativeiro, principalmente às estruturas experimentais, desta forma sendo mais vulnerável ao estresse. Tal fator também pode explicar a diferença de resposta entre as duas espécies.

A ausência de efeito probiótico sobre o desempenho zootécnico pode se relacionar a uma possível insuficiente concentração de probiótico fornecida e sua capacidade de colonizar o intestino. Em animais cuja flora intestinal já está estabelecida, a colonização das bactérias

probióticas somente ocorrem doses elevadas e contínuas e assim que o fornecimento cessa, a diminuição de bactérias no intestino é acentuada(6). A viabilidade e manutenção da concentração das cepas na ração durante os 14 dias também pode estar relacionado, uma vez que o probiótico deve ser viável sob condições normais de armazenamento e tecnologicamente adequados para processos industriais (6).

Além disso, no presente estudo as condições não permitiram os jundiás expressarem seu potencial máximo de crescimento, correspondente ao ganho por dia entre 1 e 1,5g, (92), existindo a possibilidade do efeito ocorrer apenas em condições ideais de desenvolvimento.

Em suma, concluímos que o probiótico é um redutor de estresse em Tilápias-do-Nilo, trazendo implicações produtivas positivas. O estresse é considerado como um dos principais desafios na produção intensiva de pescado, envolvendo fatores ambientais, densidade de ocupação durante o crescimento, desnutrição, fome, transporte, seleção, superlotação, entre outros (29).

Quando o peixe está estressado, e a intensidade do estressor persiste por um período prolongado, sua capacidade de resistir à agressão pode ser enfraquecida, causando problemas em vários sistemas fisiológicos dos peixes (16), incluindo a reprodução (72, 86), crescimento(73), sistema endócrino (32) e comportamento (63).

Com base nisso e no fato de que animais não estressados ou que enfrentam melhor o estresse, recuperam a homeostase mais rapidamente, interferindo de forma direta na melhor condição de bem estar e expressão de sua capacidade de desempenho (48), fornecer probiótico para Tilápia-do-Nilo pode auxiliá-la no enfrentamento ao estresse decorrente do processo produtivo, com maior resistência ao manejo, aos desafios ambientais e menor incidência de doenças (76, 27, 47).

Não descartamos a possibilidade de possível ação do probiótico na resposta ao estresse de Jundiá e no desempenho zootécnico devido a limitações encontradas no estudo, portanto sugerimos como base para novos testes com probióticos em jundiá: 1) A criação de um grupo controle e um grupo tratado paralelo, para eliminar a interferência do estresse da biometria, realizando apenas uma avaliação inicial e final dos lotes; 2) Manter cuidado especial com a qualidade da água, garantindo parâmetros que permitam a expressão total de desempenho; 3) Eliminar qualquer fator externo de manejo e instalação, principalmente se o foco for avaliação de estresse; 4) Observar a fase de desenvolvimento dos animais no momento da avaliação ao estresse, respeitando o pico de liberação do cortisol; 5) Realizar estudos em tanques próprios para produção, obtendo informações mais próximas da realidade; 6) Periodicamente avaliar a viabilidade das cepas na ração para confirmar se os animais estão

recebendo concentrações constantes; 7) Testar diferentes concentrações do probiótico, pois podem interferir na colonização do intestino dos peixes; 8) Fazer análise microbiológica do intestino para avaliar aderência e colonização das cepas; 9) Desenvolver estudos com diferentes fases de desenvolvimento dos peixes.

4. CONCLUSÕES

Ao avaliar o efeito do probiótico multiespécie no desempenho zootécnico e na resposta ao estresse de Jundiá (*Rhamdia quelen*) e Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), concluímos que:

- O probiótico atua como redutor de estresse em juvenis de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*);
- O probiótico não apresenta efeito sobre a resposta ao estresse de juvenis de Jundiá (*Rhamdia quelen*);
- O probiótico apesar de não interferir na resposta ao estresse, não é estressante para a espécie Jundiá (*Rhamdia quelen*);
- O probiótico não possui efeito sobre o desempenho zootécnico de Jundiá (*Rhamdia quelen*) e Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mercado de alimentos tem crescido intensamente no mundo inteiro e os padrões de exigência alimentar da população se elevado. Uma das atividades e que apresenta uma crescente importância no cenário mundial e nacional é a aquicultura, onde o Brasil está inserido como grande potencial na atividade devido suas condições naturais, clima favorável e sua matriz energética.

A busca por uma produção aquícola saudável, sustentável e rentável, tem sido o alvo de muitos pesquisadores, que buscam soluções para os mais diversos desafios enfrentados na atividade.

Neste contexto, os resultados descritos nesta dissertação apontam para o probiótico como uma ótima alternativa para auxiliar Tilápias-do-Nilono enfrentamento do estresse decorrente do processo produtivo. Produzindo desta forma, animais mais saudáveis, com maior resistência ao manejo, aos desafios ambientais e menor incidência de doenças.

6. REFERÊNCIAS

1. Abate CM, Castro GR, Siñeriz F, Callieri D a S. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett.* 1999;21:249–252.
2. Aluru N, Vijayan MM. Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology.* 2008;149(February):4577–4588.
3. Acqua Imagem. [Internet] 2016. Available from: <http://advocate.gaalliance.org/brazilian-aquaculture-constraints-and-challenges-part-1/#sthash.BMsugVRH.dpuf>
4. Avella MA, Gioacchini G, Decamp O, Makridis P, Bracciatelli C, Carnevali O. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture. Elsevier B. V.*; 2010; 305 (1-4) 12-19.
5. Bagheri T, Hedayati SA, Yavari V, Alizade M, FarzanfarA. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months offirst feeding. *Turkish J Fish Aquat Sci.* 2008; 48 (1):43-48
6. Balcázar JL, Blas I De, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, M??zquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.* 2006;114:173–186.
7. Baldisserotto, B. e Silva, L. V. F. Qualidade da água. In: Baldisserotto, B; Radünz Neto, J. Criação de Jundiá. Santa Maria: UFSM, 2004; p. 73-91
8. Baliao DD, Dosado NS. Tilapia cage farming in freshwater reservoir using artificial diets during dry and wet seasons. *Philipp Agric Sci.* 2011;94(1):38–45.
9. Banerjee S, Khatoon H, Shariff M, Yusoff FM. Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fish Sci.* 2010; 76 (3):481-487
10. Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhier F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquac Res.* 1999; 30 (6): 437-444.
11. Barcellos LJG, Kreutz LC, De Souza C, Rodrigues LB, Fioreze I, Quevedo RM, et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture.* 2004; 237 (1-4): 229-236
12. Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture.* 2006;253:317–321.

13. Barcellos LJG, Woehl VM, Wassermann GF, Quevedo RM, Ittzés I, Krieger MH. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac Res.* 2001;32:121–123.
14. Barcellos LJG, Woehl VM, Koakoski G, Oliveira TA, Ferreira D. Author 's personal copy Physiology & Behavior Puberty in fl uences stress reactivity in female cat fish *Rhamdia quelen*. *Physiology & Behavior* 2014; 128:232-236
15. Barcellos LJG, Kreutz LC, Rodrigues LB, Fioreze I, Quevedo RM, Cericato L, et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquac Res.* 2003;34:1465–1469.
16. Barton B a. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol.* 2002;42:517–525.
17. Barton B a., Iwama GK. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis.* 1991;1(6):23–26.
18. Bernier NJ, Flik G, Klaren PHM. Chapter 6 Regulation And Contribution Of The Corticotropic, Melanotropic And Thyrotropic Axes To The Stress Response In Fishes. 1st ed. *Fish Neuroendocrinology*. Elsevier Inc.; 2009. 235-311
19. Bidhan CD, Meena DK, Behera BK, Pranob D, Mohapatra PKD, Sharma AP. Probiotics in fish and shellfish culture: Immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiol Biochem.* 2014; 40: 921-971.
20. Bonga WSE. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997; 77 (3): 591-625
21. Borriss R, Chen XH, Rueckert C, Blom J, Becker A, Baumgarth B, et al. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7 T and FZB42 T: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete gen. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61:1786–1801.
22. Boscardim NR. A produção aquícola brasileira. Estud setorial para consolidação uma aquíicultura sustentável no Brasil [Internet]. 2007;313. Available from: ftp://ftp.fao.org/fi/document/aquaculture/sect_study_brazil.pdf
23. Boscolo WR, Hayashi C, Meurer F, Feiden A, Wolff L. Desempenho e características de carcaça de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de gordura. *Acta Sci Anim Sci.* 2004;26(4):443–447.
24. Cahill MM. Bacterial flora of fishes: A review. *Microb Ecol.* 1990;19:21–41.
25. Carneiro PCF. A produção do Jundiá em cativeiro. In: Baldisserotto, B.; Radünz Neto, J. *Criação de Jundiá*. Santa Maria: UFSM, 2004. p.117-141.

26. Carneiro PCF, Mikos JD. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural*. 2005;35:187–91.
27. Carnevali O, de Vivo L, Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I, Silvi S, et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*. 2006;258:430–438.
28. Chen W-H, Sun L-T, Tsai C-L, Song Y-L, Chang C-F. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. *Gen Comp Endocrinol*. 2002;126:90–100.
29. Conte FS. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl Anim Behav Sci*. 2004;86:205–223.
30. Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs*. 2010; 8: 1153-1177
31. Eknath AE, Tayamen MM, Palada-de Vera MS, Danting JC, Reyes R a., Dionisio EE, et al. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*. 1993;111(709):171–188.
32. El-Khaldi ATF. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi J Biol Sci*. King Saud University; 2010;17(3):241–246.
33. Esiobu N, Armenta L, Ike J. International Journal of Antibiotic resistance in soil and water environments. (April 2013): 37–41.
34. FAO. FAO statistical yearbook 2014: Asia and the Pacific Food and Agriculture. 2014.
35. Filho JC, Conferência Mundial da Tilápia atrai especialistas ao Rio de Janeiro. Panorama da aquicultura. 2016. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=3874>.
36. Fish US, Service W, Range N. Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Ecological Risk Screening Summary. 2015; (August 2014).
37. Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR. Prebiotics , probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*. 1999; 9: 53–61.
38. Fracalossi DM, Meyer G, Santamaria FM. Desempenho do jundiá , *Rhamdia quelen* , e do dourado , *Salminus brasiliensis* , em viveiros de terra na região sul do Brasil. 2004;345–52.
39. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66: 365-378.
40. Ganguly S, Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in

- digestion and metabolism. *Rev Fish Biol Fish.* 2012; 22(1): 11-16.
41. Gerbore J, Brutel A, Lemainque A, Mairey B, Médigue C, Vallenet D, et al. Potential Plant Growth-Promoting Rhizobacterium. 2016;4(2):4–5.
 42. Ghosh K, Sen KS, Ray a K. Characterization of Bacilli Isolated from the Gut of Rohu , *Labeo rohita* , Fingerlings and Its Significance in Digestion. *J Appl Aquac.* 2002;12(December 2012):33–42.
 43. Gibson GR, Roberfroid MB. Critical Review Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics. *The journal of nutrition.* 1995, 125: 1401-1412.
 44. Gil-Turnes C, Dos Santos AF, Da Cruz FW, Monteiro AV. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. *Rev Microbiol.* 1999;30:11–14.
 45. Gomes LC, Brinn RP, Marcon JL, Dantas L a., Brandão FR, De Abreu JS, et al. Benefits of using the probiotic Efinol®L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquac Res.* 2009;40:157–165.
 46. Gomes LDC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural.* 2000;30:179–185.
 47. Gonçalves AT, Maita M, Futami K, Endo M, Katagiri T. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Sci.* 2011;77:633–642.
 48. Gregory TR, Wood CM. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol Biochem Zool.* 1999;72:286–295.
 49. Hawrelak J. Probiotics: Choosing The Right One For Your Needs. *J Aust Tradit Soc.* 2003; 2 (2): 88-92
 50. Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A., Smertenko A., Pham Hung Van, Ammendola S, et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacterotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorder. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66 (12): 5241-5247
 51. Hong H a., Le HD, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29:813–835.
 52. Ibrahim MD. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. *J Adv Res. Cairo University;* 2013;6(2013):765–791.
 53. Junior V, Goitein R. Differences in the feeding of *Rhamdia quelen* (*Siluriformes* , *Heptapteridae*) in four distinct lotic systems. 2015;1–5.

54. Kennedy SB, Tucker JW, Neidig CL, Vermeer GK, Cooper VR, Jarrel JL, et al. Bacterial Management Strategies for Stock Enhancement of Warmwater Marine Fish: a Case Study With Common Snook (*Centropomus undecimalis*) 1998; 62 (2): 573-588.
55. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*. 2004;25:1405–1414.
56. Koakoski G, Oliveira TA, da Rosa JGS, Fagundes M, Kreutz LC, Barcellos LJG. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiol Behav*. 2012;106:129–132.
57. Kubitzka F. Aquicultura no Brasil. *Panorama da Aquicultura*. 2015;25:10–23.
58. Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2008;24:168–72.
59. Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*. 2004; 240 (1-4): 19-27.
60. Li J, Tan B, Mai K. Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaus vannamei*). *Aquaculture*. Elsevier B.V.; 2009; 291 (1-2): 35-40
61. Liu CH, Chiu CS, Ho PL, Wang SW. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J Appl Microbiol*. 2009;107:1031–1041.
62. Mello H De, Moraes JRE, Niza IG, Moraes FR De, Ozório RO a, Shimada MT, et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-nilo. *Pesqui Vet Bras*. 2013;33(6):724–30.
63. Merighe GKF, Pereira-da-Silva EM, Negrão JA, Ribeiro S. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev Bras Zootec*. 2004;33:828–37.
64. Merrifield DL, Bradley G, Baker RTM, Davies SJ. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquac Nutr*. 2010; 16 (5): 496-503
65. Mohapatra S, Chakraborty T, Kumar V, Deboeck G, Mohanta KN. Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2013;97:405–30.
66. Moriarty DJW. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 1998;164:351–8.

67. Nayak SK. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* Elsevier Ltd; 2010;29(1): 12–14.
68. Nayak SK, Swain P, Mukherjee SC. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shellfish Immunol.* 2007;23:892–896.
69. Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:410–416.
70. Oliveira EGD. *Produção de Tilápia Mercado, Espécie, Biologia e Recria.* Embrapa. 2007;
71. Oliveira STL De, Veneroni-Gouveia G, Santurio JM, Matiuzzi M. *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after the intake of aflatoxins. 2013; 400-406.
72. Pickering a. D, Pottinger TG, Carragher J, Sumpter JP. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen Comp Endocrinol.* 1987;68(1979):249–259.
73. Pickering a. D. Growth and stress in fish production. *Aquaculture.* 1993;111:51–63.
74. Popma T, Masser M. *Tilapia Life History and Biology.* South Reg Aquac Cent. 1999;(283).
75. Raida MK, Larsen JL, Nielsen ME, Buchmann K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B-licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis.* 2003;26:495–498.
76. Raj JA, Suresh V, Marimuthu K, Appelbaum S. Probiotic performance on fish fry during packing, transportation stress and post-transportation condition. *J Fish Aquat Sci.* 2008;3(May 2016):152–157.
77. Reid SG, Vijayan MM, Perry SF. Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Physiol B-Biochemical Syst Environ Physiol.* 1996; 165: 665-676.
78. Rana KJ, Siriwardena S, Hasan MR. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production [Internet]. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper.* 2009. 63 p. Available from: <Go to ISI>://CABI:20103269836
79. Reyes-Becerril M, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-López V, Barbosa-Solomieu V, et al. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res.* 2011;42(Gatlin 2002):1676–1686.
80. Rico-Mora R, Voltolina D, Villaescusa-Celaya JÁ. Biological control of *Vibrio*

- alginolyticus in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aqua Eng.* 1998; 19 (1): 1-6.
81. Ringo E, Birkbeck TH, Munro PD, Uadstein P, Hjelmeland K. The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *J Appl Bacteriol.* 1996;81:207–211.
 82. Ringo E, Olsen RE. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) 1999; 22-28
 83. Ringo, E, Zhou, Z., He, S., & Olsen, R. E. Effect of stress on intestinal microbiota of Arctic charr, Atlantic salmon, rainbow trout and Atlantic cod: A review. *African Journal of Microbiology Research.* 2014; 8(7), 609-618
 84. Rinkinen M, Jalava K, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: A risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet Microbiol.* 2003;92:111–119.
 85. Rurangwa E, Laranja JL, Van HR, et al. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. *Journal of Applied Microbiology.* 2009; 106: 932–940.
 86. Schreck CB. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;165(3):549–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>
 87. Santos CRD, Cavalcante ALM, Hauser-Davis RS, Lopes RM, Da Costa Mattos RDCO. Effects of sub-lethal and chronic lead concentrations on blood and liver ALA-D activity and hematological parameters in Nili Tilapia. *Ecotoxicol Environ Saf.* Elsevier; 2016; 129: 250-256.
 88. Santos J, benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 278 (6): G 847-854.
 89. Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, Perdue MH. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *AmJPhysiol.* 1994; 267 (0002-9513): G 7994-7999.
 90. Schereck CB. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp endocrinol.* Elsevier Inc.; 2010; 165 (3): 549-556.
 91. Sengupta A, Sharma RK. Acute heat stress in growing rats: effect on small intestinal morphometry and in vivo. *J. Therm. Biol.* 1993; 18 (3):145-151.
 92. Silva da LB, Barcellos LJG, Quevedo RM, de Souza SMG, Kreutz LC, Ritter F, et al. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: Initial growing period. *Aquaculture.* 2006; 255 (1-4): 417-428.
 93. Silva da LB, Barcellos LJG, Quevedo RM, de Souza SMG, Kessler ADM, Kreutz LC,

- et al. Introduction of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) increases the productivity of carp polyculture in southern Brazil. *Aquac Res.* 2008; 39 (5): 542-551.
94. Souza DM De, Martins GB, Piedras SRN, Pouey JLOF, Robaldo RB, Leite FPL. Probiotic actions of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* in silver catfish (*Rhamdia quelen*) larvae culture. *Rev Bras Zootec.* 2012;41:815–819.
 95. Taoka Y, Maeda H, Jo J-Y, Jeon M-J, Bai SC, Lee W-J, et al. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Sci.* 2006;72:310–321.
 96. Turnbull P.C.B. *Bacillus*. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 15.
 97. Vaseeharan BPR. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 36: 83-87.
 98. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:655–671.
 99. Yuan J, Li B, Zhang N, Waseem R, Shen Q, Huang Q. Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *J Agric Food Chem.* 2012;60:2976–2981.
 100. Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi AR, Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture.* 2006;252:516–524.
 101. Zimmermann S. O bom desempenho das chitraladas no Brasil. [Internet]. 2000. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/60/chitraladas.asp>