

Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo¹

Hurzana de Mello², Julieta R.E. Moraes^{2*}, Ines Garcia Niza³, Flávio Ruas de Moraes², Rodrigo O.A. Ozório⁴, Marina Tie Shimada², Jair R. Engracia Filho² e Gustavo S. Claudiano²

ABSTRACT- Mello H., Moraes J.R.E., Niza I.G., Moraes F.R., Ozório R.O.A., Shimada M.T., Engracia Filho J.R. & Claudiano G.S. 2013. [**Beneficial effects of probiotics on the intestine of juvenile Nile tilapia.**] Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(6):724-730. Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciência Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: julietaengracia@gmail.com

The aim of this study was to evaluate the survival rate, the intestinal microbiota, the mucosal integrity, and the carcass quality of juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, after 80 days being fed on a diet containing probiotic additive (*Bacillus cereus* 4.0x10⁸ CFUg⁻¹ and *Bacillus subtilis* 4.0x10⁸ CFUg⁻¹), at the ratio of 4g/kg of pelleted feed. The completely randomized design with two treatments was used: one control group and one group fed on the mentioned diet. The evaluation of survival rate, the intestinal microbiota analysis by microbiological culture, histomorphometrical analysis of intestinal mucosa and chemical analysis of carcass was performed. The results showed that tilapias from the treated group had higher relative survival rate (P<0.05) than the control group, higher number of colony-forming units (P<0.05) regarding intestinal colonization by *B. cereus* and *B. subtilis*, and higher rates of intestinal mucosal integrity (P<0.05), evaluated by histomorphometry. As for the latter, the group being fed on feed with probiotic additive was observed to have higher and larger villi, besides having a higher number of goblet cells than the control group. Concerning the carcass quality, the results showed that there was positive interference (P<0.05) of the probiotic on the treated group in comparison to the control group as in regard to levels of protein and ether extract. These results allow the inference that the supplementation with probiotic, as tested in this experiment, led to the intestinal colonization by beneficial bacteria and resulted in higher relative survival rate, decreased the mucosal desquamation and helped in the increase of the number of goblet cells.

INDEX TERMS: Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, probiotics, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, intestinal morphometry.

¹ Recebido em 10 de agosto de 2012.

Aceito para publicação em 17 de abril de 2013.

² Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciência Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mails: hurzana@gmail.com, fruasmoraes@gmail.com, jair.rodini@hotmail.com, claudianovet@hotmail.com, thalitarpetrillo@hotmail.com, *Autor para correspondência: julietaengracia@gmail.com

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Rua Professor Cid dos Santos, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, Lisboa, 1300-477, Portugal. E-mail: inesniza@gmail.com

⁴ Centro de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, Porto, 4050-123, Portugal. E-mail: rodrigo.ozorio@ciimar.up.pt

RESUMO.- Os objetivos deste trabalho foram os de avaliar o percentual de sobrevivência, a microbiota intestinal, a integridade da mucosa, e a qualidade da carcaça de juvenis de Tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, após 80 dias de alimentação com dieta contendo aditivo probiótico (*Bacillus cereus* 4,0x10⁸ UFCg⁻¹ e *Bacillus subtilis* 4,0x10⁸ UFCg⁻¹), na proporção de 4g/kg de ração peletizada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos, sendo um grupo controle e outro alimentado com dieta adicionada de probiótico. Foram realizados os cálculos do percentual de sobrevivência relativa, análise da microbiota intestinal por cultura microbiológica, análise histomorfométrica da mucosa intestinal e análise químico-bromato-

lógica da carcaça dos peixes. Os resultados demonstraram que as tilápias do grupo tratado apresentaram percentual de sobrevivência relativa maior ($P < 0,05$) que o do grupo controle e colonização intestinal por *B. cereus* e *B. subtilis* com maior ($P < 0,05$) número de unidades formadoras de colônia em relação ao grupo controle. A análise histomorfométrica demonstrou que o grupo alimentado com aditivo probiótico apresentou vilosidades mais altas e mais largas, além de maior número de células calciformes que o observado no grupo controle ($P < 0,05$). Em relação à qualidade de carcaça os resultados demonstraram que houve interferência positiva ($P < 0,05$) do probiótico no grupo tratado em relação ao controle quanto aos teores de proteína e extrato etéreo. Estes resultados permitem inferir que a suplementação com probiótico, como testado neste estudo, induziu a colonização intestinal por bactérias benéficas e promoveu maior percentual de sobrevivência relativa, diminuiu a descamação da mucosa, e favoreceu o aumento do número de células calciformes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, probióticos, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, morfometria intestinal.

INTRODUÇÃO

Os probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos capazes de colonizar, estabelecer-se e multiplicar-se no intestino do hospedeiro e promover o equilíbrio da microbiota com benefícios para o hospedeiro. Estes benefícios são decorrentes da inibição da proliferação de agentes prejudiciais ao epitélio de revestimento da mucosa intestinal e há evidências da melhora no desempenho zootécnico graças à melhor digestibilidade e absorção de nutrientes (Nayak 2010a,b). Programas de profilaxia baseados na utilização de imunógenos e/ou probióticos permitem a obtenção de peixes com melhor qualidade sanitária devido a melhora da qualidade imunomoduladora (Geovanny et al. 2007, Merrifield et al. 2010c, Nayak 2010a, 2010b, Dimitroglou et al. 2011).

Os microrganismos probióticos utilizados em piscicultura pertencem aos gêneros *Saccharomyces*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Shewanella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Aeromonas* e outros (De Rodriganez et al. 2009, Kim et al. 2010, Nayak 2010a). Microrganismos como *Lactococcus* (Hagi et al. 2004, Sugita et al. 2009), *Bacillus* sp. (Kumar et al. 2006, 2008), *Lactobacillus* (Ramakrishnan et al. 2008) e *Saccharomyces cerevisiae* (Pal et al. 2007, Ramakrishnan et al. 2008) foram utilizados como probióticos na ração de carpas, e não se mostraram patogênicos ou tóxicos e puderam se estabelecer, se multiplicar e colonizar o epitélio de revestimento do intestino do hospedeiro (Ramakrishnan et al. 2008).

O gênero *Bacillus* é utilizado como aditivo alimentar na aquicultura por sua resistência à altas temperatura e pressão (Rengpipat et al. 2000, Ochoa-Solano & Olmos-Soto 2006), com benefícios para o desempenho produtivo, sobrevivência, imunidade, resistência a doenças, (Gatesoupe 1999, Gomez-Gil et al. 2000, El-Dakar et al. 2007, Nayak et al. 2007), conversão alimentar, a taxa de eficiência proteica (*Onchorhynchus mykiss*) (Bagheri et al. 2008, Merrifield et al. 2010a).

Além disso, contribui para a melhora da qualidade da água como biorremediação (Kennedy et al. 1998, Moriarty 1998).

Outros autores demonstraram efeitos positivos usando uma ou duas cepas probióticas e descrevem os efeitos benéficos na piscicultura e carcinicultura (Lara-Flores et al. 2003, Ziaei-Nejad et al. 2006).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do probiótico constituído por *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* sobre o percentual de sobrevivência, microbiota intestinal, integridade da mucosa e composição químico-bromatológica da carcaça de juvenis de Tilápias-do-Nilo mantidas em condições laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 114 juvenis de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ($100 \pm 8,2$), distribuídos ao acaso em seis tanques de 250 L cada ($n=19$), abastecidos com água corrente livre de cloro, vazão 1L/min., alimentados com ração comercial durante 10 dias para aclimação e posteriormente, durante 80 dias, com ração formulada de acordo com NRC (1993) e expressa no Quadro 1.

Os peixes foram distribuídos em três grupos, o primeiro alimentado com dieta contendo o aditivo probiótico (*Bacillus cereus* $4,0 \times 10^8$ UFCg-1 e *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^8$ UFCg-1) misturado à ração na proporção de 4g/kg foi formado por 76 exemplares (38 para histomorfometria e 38 para exames microbiológicos) e 38 constituíram o grupo controle.

A qualidade da água foi determinada semanalmente durante o período experimental e apresentaram valores médios e desvios-padrão (temperatura = $30,20 \pm 0,8^\circ\text{C}$, pH = $7,96 \pm 0,28$, oxigênio dissolvido = $7,96 \pm 2,48\text{mgL}^{-1}$) dentro das recomendações (Sibaúba-Tavares 1995). O sifonamento do fundo dos aquários e a renovação de água impediram o acúmulo de matéria orgânica.

Percentual de sobrevivência relativa

A eficiência da alimentação com o aditivo probiótico foi avaliada com base no percentual de sobrevivência relativa (PSR), adaptada de Amend (1981):

PSR: $[1 - (\% \text{mortalidade no grupo suplementado} / \% \text{mortalidade grupo controle})] \times 100$

Quadro 1. Composição porcentual e químico bromatológica das dietas utilizadas

Ingrediente	%	Composição calculada	
Peixe, farinha	25,30	Energia Bruta Kcal/Kg	4178,50
soja-45%PB, Farelo	17,00	Matéria seca (%)	90,15
Milho	28,25	Proteína Bruta (%)	26,46
Trigo, farelo	22,00	Extrato Etéreo (%)	6,12
Arroz, quirera	4,00	Fibra Bruta (%)	4,06
Óleo de soja degomado	2,00	Cinzas (%)	7,79
BHT, antioxidante	0,02	Ca (%)	1,85
Fosfato bicálcio	0,30	P (%)	0,91
Calcário	0,50		
Premix	0,50		
Vitamina C	0,03		
Antifúngico (Filax)	0,10		

*Complexo mineral e vitamínico: Ca (max) 1,8%; P(min)0,6%;Cu 15mg/kg I 7,5mg/kg; Fe 150 mg/kg; Mn 105mg/kg; Se 0,22mg/kg; Zn 225mg/kg; ácido fólico 1,5mg/kg; ácido pantotênico 30mg/kg; BHT 125mg/kg; colina 225mg/kg; vit.A 4500 UI/kg; Vit.B1 30mg/kg; vit.B2 12 mg/kg; vit.B6 4,5 mg/kg; vit.C 300mg/kg; vit.D3 4500 UI/kg; vit.E 250 UI/kg; vit.K 9mg/kg; niacina 150 Mg/kg; biotina 0,15mg/kg

Análise da microbiota intestinal das tilápias

Para análise microbiológica da flora intestinal os peixes sofreram eutanásia por anestesia profunda em solução de benzocaína (1:500 v/v) e após assepsia local com álcool 70% G.L., foi coletado o intestino na sua totalidade e transferido para placa de Petri esterilizada. A seguir o intestino foi pesado em balança analítica e acondicionado em tubos de ensaio. Após a pesagem foi macerado em tubos de ensaio previamente esterilizados, diluídos em séries de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , homogeneizados em Vortex (Ishikawa 1998). Seguiu-se a semeadura em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (ágar tripticaseína de soja) (Irianto & Austin 2002). As placas foram incubadas em estufa a 30°C, durante 72 horas, para posterior contagem das colônias em contador de colônias e identificadas de acordo com suas características de crescimento e análise pelo método de Gram.

Análise histomorfométrica das vilosidades intestinais

Para coleta do intestino os peixes (n=7), foram submetidos à eutanásia por anestesia profunda com benzocaína (1:500 v/v) e foi retirado um segmento de 3,0cm, distante 3,0 cm do píloro. Após a remoção o segmento foi seccionado no sentido longitudinal e as extremidades presas à uma base de cartolina retangular, de modo a manter as vilosidades expostas. Cada fragmento de intestino foi colocado em frasco com solução de Bouin, onde foram fixados durante 12 horas. A conservação posterior foi feita em álcool 70° até o momento do processamento histológico de rotina. Os intestinos foram cortados em seções de 0,5cm e preparados segundo a técnica usual de histotecnologia para obtenção de cortes em parafina com 3 µm de espessura que foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

A obtenção das medidas de altura e altura total das vilosidades (Fig.1) corresponderam à distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e do ápice das vilosidades até o término da serosa, respectivamente; a largura das vilosidades e a espessura do seu epitélio também foram medidas.

Estes procedimentos foram realizados em microscopia de luz AX10 Zeiss, câmera AxioCam MRC, com auxílio do "software" Scope A1. As fotos foram registradas com uso da câmera Olympus DP72.

Análises químico-bromatológicas

Para as análises da composição químico-bromatológica da carcaça foram moídos integralmente 10 peixes do grupo que re-



Fig.1. Parede intestinal de tilápia-do-Nilo. Nela podem ser observadas: (a) altura total das vilosidades; (b) altura das vilosidades; (c) largura das vilosidades; (d) espessura do epitélio das vilosidades. Hematoxilina, obj.10x.

cebeu ração com aditivo probiótico e 10 peixes do grupo controle utilizando-se moedor de carne, até obter-se uma polpa homogênea. Esta polpa foi seca em estufa a 55°C, por 48 horas e moída em moinho bola. A análise da composição química bromatológica das amostras de carcaça foram realizadas pela metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA e quando significativas às diferenças foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Snedecor & Cochran, 1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o percentual de sobrevivência relativa dos peixes foi maior (89,47%) nos peixes alimentados com o aditivo probiótico ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (76,61%).

O Quadro 2 expressa a contagem do número de colônias de bactérias oriundas do conteúdo intestinal cultivadas em ágar tripticaseína de soja (TSA). As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal, quando atingido um número mínimo de unidades formadoras de colônias (UFC) (Oksanen et al. 1990).

Quadro 2. Resultados da análise da microbiota intestinal de Tilápias-do-Nilo alimentadas com ração com ou sem aditivo probiótico pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*

Tratamento	Trato Intestinal
Grupo controle	7.094 ^A
Grupo tratado	9.698 ^B
Valor de F	5.03
CV*	29.35

Letras diferentes diferem-se entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) *Coeficiente de variação.

Os peixes que receberam dieta com aditivo probiótico apresentaram colonização intestinal por *B. cereus* e *B. subtilis* ($P > 0,05$) e o número de unidades formadoras de colônia foi superior ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Estes dados corroboram os encontrados em pós-larvas de Tilápias-do-Nilo, alimentadas com ração contendo cinco e 10g de probiótico kg^{-1} , contendo *Bacillus subtilis* (1.15×10^4 e 4.74×10^5 UFC) (Tachibana et al. 2011).

O efeito do probiótico sobre o hospedeiro parece estar relacionado ao tempo de alimentação. Carnevali et al. (2004) observaram que, durante os primeiros 35 dias de criação de larvas de *sea bream* (*Brama australis*), tanto as bactérias anaeróbicas quanto as aeróbicas intestinais não haviam sofrido modificações com a inclusão dos *Lactobacillus* spp. Esses autores mostraram alterações significativas da microbiota após o 66º dia de suplementação.

Os microrganismos aptos a colonizar o intestino, como os contidos nos probióticos, devem se adaptar à especificidade física, química e biótica do ambiente intestinal, e resistir às ações da bile, enzimas digestivas, sistema imune do hospedeiro, anaerobiose e variações do pH. O sucesso da colonização também envolve a competição com outras bac-

térias por sítios de ligação, nutrientes e resistência a toxinas produzidas por outras bactérias (Makridis et al. 2000, Ouwehand et al. 2002, Vaughan et al. 2002).

Vários autores apontaram o efeito benéfico de probióticos por inibir o desenvolvimento de microrganismos prejudiciais, geralmente utilizando a inoculação artificial de patógenos específicos (Gram et al. 1999, Verschuere et al. 2000, Nikoskelainem et al. 2001). De acordo com Abidi (2003), os probióticos agem sobre os outros componentes da microbiota por exclusão competitiva. Entretanto, a adesão e a colonização do trato gastrointestinal só podem ser

Quadro 3. Média \pm desvio padrão dos valores observados quanto à altura, altura total e largura das vilosidades e espessura do epitélio (μm) da mucosa da porção média do intestino de juvenis de Tilápias-do-Nilo após 90 dias de alimentação

Parâmetros	Tratamento	
	Grupo Controle	Grupo Tratado
Altura Total dos Vilos	130,4 \pm 22 ^A	154,2 \pm 34,3 ^B
Altura dos Vilos	110,5 \pm 20 ^A	130,7 \pm 27,8 ^B
Largura dos Vilos	30,6 \pm 4,1 ^A	40,9 \pm 9,1 ^B
Espessura do Epitélio dos Vilos	17,7 \pm 13	17 \pm 2,1

Valores seguidos de letras diferentes diferem-se entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).



Fig.2. Parede intestinal mostrando a camada epitelial das vilosidades da porção média do intestino de juvenis de Tilápias-do-Nilo. (A) Tratamento controle. (B) Tratamento com aditivo probiótico. Hematoxilina, obj.20x.

confirmadas com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Ringo et al. 2003).

O efeito benéfico do probiótico reduz a colonização por bactérias prejudiciais à mucosa, por inibir sua aderência ao enterócito, por meio da ligação com o glicocálix. Esta ligação promove a exclusão competitiva de bactérias indesejáveis por meio da aderência aos sítios de ligação dos enterócitos (glicocálix), nos diferentes segmentos do intestino (Furlan 2005).

A análise histomorfométrica do intestino (Quadro 3) mostrou que a altura, altura total e largura das vilosidades e da espessura do epitélio da mucosa apresentaram valores significativamente maiores (P<0,05) nos peixes alimentados com ração contendo o probiótico se comparado ao observado nos peixes controle.

Como se observa, os peixes alimentados com ração contendo o probiótico mostraram diferenças significativas quanto à constituição estrutural do epitélio das vilosidades da mucosa, quando comparado ao observado nos peixes do tratamento controle Fig.2. A integridade da mucosa intestinal medida pela técnica ora utilizada está relacionada com a renovação celular do epitélio, que indicou aumento do número de suas células epiteliais e caliciformes. Então a diferença observada mostra que o probiótico favoreceu a renovação do epitélio intestinal corroborando os resultados de Medri et al. (1999), para a mesma espécie, porém, alimentadas com ração suplementada com levedura alcooleira.

A contagem do número de células caliciformes (Quadro 4) apresentou diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos. Nos peixes que receberam o probiótico o número de células caliciformes (Fig.3) foi maior que o observado no grupo controle e, junto com as células epiteliais, é proporcional à altura das vilosidades intestinais.

O aumento da população de células caliciformes da mucosa no intestinal de peixes está relacionado com a boa qualidade do microambiente local. As células caliciformes proliferam-se para aumentar a produção de muco quando ocorre a agressão por agentes patogênicos (Schwarz et al. 2010). Então a adição de probióticos à ração favorece o aumento do número de células caliciformes e pode contribuir para a defesa contra a ação de bactérias prejudiciais à mucosa.

A camada de muco constituído por glicoproteínas insolúveis em água secretada pelas células caliciformes tem papel importante na proteção contra infecções, pois impede o contato de microrganismos com as células epiteliais e tem efeito bactericida devido à presença de lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular (Noga 1995).

As alterações verificadas no grupo alimentado com ração suplementada mostraram caráter benéfico sobre as

Quadro 4. Média \pm desvio padrão do número de células do epitélio da mucosa intestinal da porção média do intestino de juvenis de Tilápias-do-Nilo após 80 dias

Parâmetros	Tratamento	
	Grupo controle	Grupo Tratado
N ^o Células caliciformes	220,62 \pm 18,55 ^A	521,88 \pm 45,72 ^B
N ^o de Vilos	6,41 \pm 0,562 ^A	5,37 \pm 0,798 ^B

Letras diferentes diferem-se entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

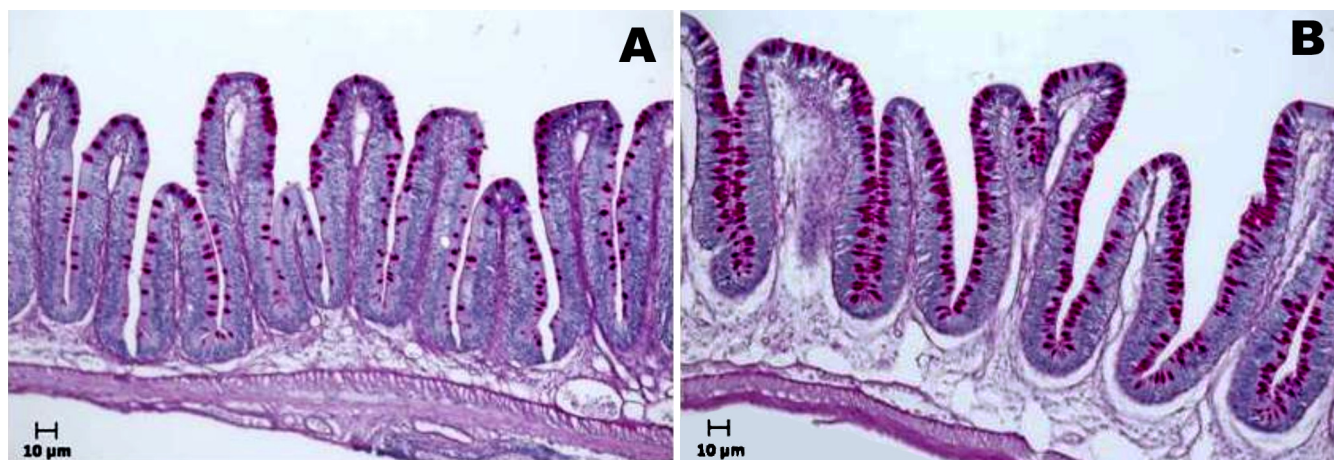


Fig.3. Parede intestinal mostrando a camada epitelial das vilosidades da porção média do intestino de juvenis de Tilápias-do-Nilo, mostrando as células caliciformes. (A) Tratamento com aditivo probiótico. (B) Tratamento controle. Células caliciformes (setas). PAS, obj.20x.

relações morfométricas do epitélio mucoso, que podem favorecer o aumento da área de absorção assim como sua defesa pelo maior número de células caliciformes produtoras de muco dotado de substâncias anti-bacterianas (Noga 1995).

Segundo Radecki & Yokoyama (1991) os probióticos adicionados à dieta estimulam o crescimento e a estabilidade de populações bacterianas que, ao fermentá-las, produzem ácidos orgânicos que reduzem o pH luminal e inibem a proliferação de bactérias nocivas ao epitélio pois são produtoras de sulfido, amônia e toxinas feólicas, que contribuem para a redução do processo descamativo.

A adição de probiótico contendo *Lactobacillus delbrueckii* e bactérias ácido lácticas à dieta de salmonídeos demonstrou a interação entre estas bactérias e a microflora intestinal do hospedeiro produzindo efeitos benéficos sobre a morfologia da mucosa intestinal e a absorção de nutrientes que favorecem a saúde e a performance dos peixes (Salinas et al. 2008, Sweeteman et al. 2008, Merrifield et al. 2010a, Ringo et al. 2010).

Neste trabalho *B. cereus* e *B. subtilis* adicionados à dieta dos peixes, provavelmente foram incorporados à microbiota intestinal e competiram de modo efetivo com bactérias prejudiciais à mucosa. Como resultado houve influência positiva na altura e largura dos vilos, assim como na espessura das células epiteliais de revestimento da mucosa, e no aumento do número de células caliciformes. As diferenças entre os valores da morfometria sugerem o grau de eficiência do probiótico.

Os resultados deste trabalho demonstraram que os valores da composição corporal dos peixes que receberam dieta suplementada com probiótico apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os teores de proteína bruta e extrato etéreo conforme expresso no Quadro 5, com maior teor protéico e menor teor de gordura na carcaça. O grupo de peixes alimentado com ração contendo probiótico apresentou melhor aproveitamento da proteína e, maior porcentagem desse nutriente na carcaça. O inverso aconteceu com o teor de gordura. Portanto, neste estudo, o uso de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, em dietas para juvenis

Quadro 5. Valores médios e desvio padrão da análise da composição químico bromatológica da carcaça de Tilápias-do-Nilo alimentadas com ração com ou sem aditivo PAS-TR®

	% MS	% Cinza*	% PB*	% EE*
Grupo de Controle	37,56±0,19 ^A	18,8±0,52 ^A	49±0 ^A	30,87±0,01 ^A
Grupo Tratado	30,42±0,01 ^A	16±0,21 ^A	54±0,6 ^A	27,32±0,3 ^A

Valores seguidos de letras diferentes diferem-se entre se pelo teste Tukey ($P < 0,05$) *Base na matéria seca.

de tilápia, foi satisfatório também neste aspecto na medida em que sugere a possibilidade de aumento da deposição de proteína na carcaça e diminuição do teor de gordura com a suplementação alimentar com o probiótico testado. Resultados semelhantes foram observados por Fujimoto et al. (2007) em que *Piaractus mesopotamicus* alimentados com ração suplementada com cromo trivalente apresentaram aumentos significativos na eficiência de retenção de proteína bruta e na porcentagem de proteína bruta na carcaça, diminuição de eficiência de retenção de gordura e menores valores de porcentagem de gordura.

O efeito benéfico da adição de probióticos na dieta reside na maior integridade da mucosa intestinal que por aumentar sua área de absorção aumenta a retenção de nutrientes que por sua vez conduzem a melhor condição homeostática dos peixes com melhora do percentual de sobrevivência relativa. Este resultado pode ser atribuído à ação inibitória das bactérias do probiótico sobre a multiplicação de bactérias prejudiciais à mucosa intestinal, de modo a favorecer sua integridade, com melhora para a digestibilidade e absorção de nutrientes e condicionar melhor equilíbrio orgânico para os peixes.

CONCLUSÃO

Os resultados permitem sugerir que a dieta adicionada de probiótico (*Bacillus cereus* $4,0 \times 10^8$ UFCg⁻¹ e *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^8$ UFCg⁻¹) para as Tilápias-do-Nilo, nas condições testadas interferiu significativamente no percentual de sobrevivência relativa; induziu o aumento da altura, altura total e largura das vilosidades, assim como na espessura

das células epiteliais de revestimento e número de células calciformes da mucosa intestinal; interferiu positivamente quanto aos teores de proteína e extrato etéreo das carcaças dos peixes tratados.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- Abidi R. 2003. Use of probiotics in larval rearing of new candidate species. *Aquacult.* 8:5-16.
- Amend D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Develop. Biol. Stand.* 49:447-454.
- Bagheri T., Hedayati S.A., Yavari V., Alizade M. & Farzanfar A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aqu. Sci.* 8:43-48.
- Carnevali O., Zamponi M.C., Sulpizio R., Rollo A., Nardi M., Orpianesi C., Silvi S., Caggiano M., Polzonetti A.M. & Cresci A. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquacult. Int.* 12:377-386.
- De Rodriganez M.S., Diaz-Rosales P., Chabrillon M., Smidt H., Arijo S., Leon-Rubio J., Alarcon F.J., Balebona M.C., Moriñigo M.A., Cara J.B. & Moyano F.J. 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Aquacult. Nutr.* 15:177-185.
- Dimitroglou A., Merrifield D.L., Carnevali O., Picchiatti S., Avella M., Daniels C.L., Güroy D. & Davies S.J. 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production: A Mediterranean perspective. *Fish Shelf Immunol.* 30:1-16.
- El-Dakar A.Y., Shalaby S.M. & Saoud I.P. 2007. Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *iganus rivulatus* survival and growth. *Aquacult. Nutr.* 13:407-412.
- Fujimoto R.Y., Castro M.P., Honorato C.A. & Moraes F.R. 2007. Composição corporal e eficiência de utilização de nutrientes por pacus alimentados com ração suplementada com cromo trivalente. *Pesq. Agropec. Bras.* 42:1763-1768.
- Furlan R.L. 2005. Avaliação e uso de pré e probióticos. *Anais Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó*, p.58-74. (Resumo)
- Gatesoupe F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquacult.* 180:147-165.
- Geovanny G.R., Luis B.J. & Shen M. 2007. Probiotics as control agents in Aquaculture. *J. Ocean Univ. China* 6(1):76-79. (English edition)
- Gomez-Gil B., Roque A. & Turnbull J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquacult.* 191:259-270.
- Gram L., Melchiorson J., Spanggard B., Huber I. & Nielsen T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3):969-732.
- Hagi T., Tanaka D., Iwamura Y. & Hoshino T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquacult.* 234:335-346.
- Irianto A. & Austin B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 25:333-342.
- Ishikawa C.M. 1998. Quantificação bacteriana e avaliação das lesões em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo) inoculados experimentalmente com *Mycobacterium marinum* ATCC 927. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP. 59p.
- Kennedy S.B., Tucker J.W., Neidig C.L., Vermeer G.K., Cooper V.R., Jarrell J.L. & Sennett D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: A case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* 62:573-588.
- Kim J.S., Harikrishnan R., Kim M.C., Balasundaram C. & Heo M.S. 2010. Dietary administration of *Zooshikella* sp enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Serpotococcus iniae*. *Fish Shelf Immunol.* 29:104-110.
- Kumar R., Mukherjee S.C., Prasad K.P. & Pal A.K. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquacult. Res.* 37:1215-1221.
- Kumar R., Mukherjee S.C., Ranjan R. & Nayak S.K. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shelf. Immunol.* 24:168-172.
- Lara-Flores M., Olvea-Novoa M.A. & Guzman-Mendez B.E. 2003. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult.* 216:193-201.
- Makridis P., Fjellheim A.J., Skjermo J. & Vadstein O. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or biencapsulated in rotifers. *Aquacult. Int.* 8(5):367-380.
- Medri V., Pereira G.V., Leonhardt J.H., Panini M.S. & Dietzel S. 1999. Avaliação sensorial de filés de tilápias alimentadas com diferentes níveis de levedura alcooleira. *Acta Scient.* 21(2):303-308.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Bradley G., Baker R.T.M. & Davies S.J. 2010a. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.* 16:504-510.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bogwald J., Castex M. & Ringo E. 2010c. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquacult.* 302:1-18.
- Moriarty D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquacult.* 164:351-358.
- NRC 1993. Nutrient Requirements of Warm Water, Fishes and Shellfishes: nutrient requirements of domestic animals. National Research Council, Washington, DC. 125p.
- Nayak S.K. 2010a. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquacult. Res.* 41:1553-1573.
- Nayak S.K. 2010b. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shelf Immunol.* 29(2):14.
- Nayak S.K., Swain P. & Mukherjee S.C. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shelf. Immunol.* 23:892-896.
- Nikoskelanen S., Salminen S. & Bylund G. 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6):2430-2435.
- Noga E.J. 1995. Fish Disease. Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book, St Louis. 367p.
- Ochoa-Solano J.L. & Olmos S.J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol.* 23:519-525.
- Oksanen P., Salminen S., Saxelin M., Hamalainen P., Ihantola-Vormisto A., Muurasniemi-Isoviita L., Nikkara S., Oksanen T., Porsti T., Salminen E., Siitonen S., Stuckey H., Toppila A. & Vapaatalo H. 1990. Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG. *Ann. Med.* 22:53-56.
- Ouweland A.C., Salminen S. & Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:279-289.
- Pal D., Joardar S.N. & Roy B. 2007. Immunostimulatory effects of a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell wall feed supplement on rohu (*Labeo rohita*), an Indian major carp. *Israeli J. Aquacult.* 59:175-181.
- Radecki S.V. & Yokoyama M.T. 1991. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition, p.439-447. In: Miller E.R., Duane E.U. & Lewis A.J. (Eds), Swine Nutrition. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Ramakrishnan C.M., Haniffa M.A., Manohar M., Dhanaraj M., Jesu Arockiaraj A., Seetharaman S. & Arunsingh S.V. 2008. Effects of probiotics and spirulina on survival and growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli J. Aquacult.* 60:128-133.
- Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S. & Menasaveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquacult.* 191:271-288.

- Ringo E., Lovmo L., Kristiansen M., Salinas I., Myklebust R., Olsen R.E. & Mayhew T.M. 2010. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquacult.* 41:451-467.
- Ringo E., Olsen R. E., Mayhew T.M. & Myklebust R. 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquacult.* 227:1-4.
- Salinas I., Myklebust R., Esteban M.A., Olsen R.E., Meseguer J. & Ringo E. 2008. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Vet. Microbiol.* 128:167-177.
- Schwarz K.K., Furuya W.M., Natali M.R.M., Michelato M. & Gualdezi M.C. 2010. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de Tilápias-do-Nilo. *Acta Scient., Anim. Sci.* 32(2):197-203.
- Sibaúba-Tavares L.H. 1995. *Limnologia Aplicada à Aquicultura*, p.70. Funep, Jaboticabal.
- Silva D.J. & Queiroz A.C. 2002. *Análises de Alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3ª ed. Editora Universidade Federal de Viçosa, MG. 2353p.
- Snedecor G.W. & Cochran W.G. 1974. *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames. 543p.
- Sugita H., Fujie T., Sagesaka T. & Itoi S. 2009. The effect of *Lactococcus lactis* on the abundance of aeromonads in the rearing water of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus). *Aquacult. Res.* 41:153-156.
- Sweeteman J., Dimitroglou A., Davies S. & Torrecillas S. 2008. Nutrient uptake: gut morphology a key to efficient nutrition. *Int. AquaFeed* 11:27-30.
- Tachibana L., Dias D.C., Ishikawa V.M., Correa C.F., Leonardo A.F.G. & Ranzani-Paiva M.J.T. 2011. Probiótico na alimentação da tilápia-do-Nilo: desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos* 25:25-31.
- Vaughan E.E., Vries M.C., Zoetendal E.G., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L. & Devos W.M. 2002. The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:341-352.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. & Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:655-671.
- Ziaei-Nejad S., Rezaeib M.H., Takamic G.A., Lovettd D.L., Mirvaghefia A. & Shakourie M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquacult.* 252:516-524.