

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa De Pós-Graduação Em Zootecnia



Dissertação

Uso de probióticos na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824)

Vilson Borba Pinto

Pelotas, 2015

VILSON BORBA PINTO

**USO DE PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia
quelen*, Quoy & Gaimard, 1824)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Produção Animal).

Orientador: Dr. Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P659u Pinto, Vilson Borba

Uso de probióticos na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) / Vilson Borba Pinto, Cristiano Costenaro Ferreira ; Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey, orientador ; Fabrício Rochedo Conceição, coorientador. — Pelotas, 2015.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Peixe. 2. *Saccharomyces boulardii*. 3. *Bacillus cereus* variedade *toyoi*. 4. *Pichia pastoris*. 5. Microbiota intestinal. I. Ferreira, Cristiano Costenaro. II. Pouey, Juvêncio Luis Osório Fernandes, orient. III. Conceição, Fabrício Rochedo, coorient. IV. Título.

CDD : 639.311

Banca examinadora

Prof. Dr. Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey (Presidente – UFPel)

Profa. Dr. Luciano da Silva Pinto (UFPel)

Profa. Dra. Patrícia Diaz de Oliveira (UFPel)

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite (UFPel)

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus. Ele esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada, muitas vezes o caminho tornou-se tortuoso e pensei em desistir. Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou, a saber:

Agradeço aos meus pais, pelos ensinamentos e por terem me feito adotar como característica ao longo de minha vida a persistência e a determinação.

Obrigado a todos os meus familiares e aos meus amigos, em particular a minha amada esposa e filhos, pelo apoio incondicional ao longo de minha vida e em especial neste momento.

Meu muitíssimo obrigado ao meu orientador Professor Doutor Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey. Obrigado também aos amigos do curso de Biotecnologia da UFPel por acreditarem em mim e me incentivarem.

Porém não tenho como descrever a ajuda e parceria que se formou ao longo destes dois anos com meu amigo Cristiano Costenaro, que no decorrer deste processo, mesmo com todas as atribuições do doutorado, sempre se disponibilizou a ajudar a todos do laboratório e esbanjou conhecimento, que foram divididos entre todos do laboratório. Aluno de graduação e mestrado na UFSM e atualmente doutorando no PPGZ, desde o primeiro dia de aula, onde as disciplinas obrigatórias eram comuns aos mestrandos e doutorando, procurou se inserir no grupo.

Agradeço também aos amigos dos almoços de sexta-feira, no Laboratório de Ictiologia, onde sempre houve total entrosamento entre os três segmentos de nossa instituição: Docentes, Discentes e Técnicos Administrativos.

Agradeço a todos que fazem parte da família do Laboratório de Ictiologia da UFPel, Fernanda, Rodrigo, Leonardo, Daiane, Suzane, Fabiano, Mauro.... Sem a ajuda destes amigos e excelentes profissionais não haveria como realizar meus experimentos. Obrigado pela confiança e apoio! Estendo esse agradecimento ao prof. Sérgio Piedras um dos pesquisadores responsáveis pelo laboratório.

Não poderia esquecer a secretária do departamento, Norma Brasil, do PPGZ, pela paciência e pela imensa ajuda na parte burocrática do processo.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a todos os professores e colegas que me ajudaram nesta árdua caminhada. Muito obrigado!

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

O difícil se faz agora,
o impossível demora um pouco mais
(autor desconhecido)

O caminho de mil quilômetro
começa com o primeiro passo,
LAO TZU

RESUMO

PINTO, Vilson Borba. **Uso de probióticos na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824)**. 2015. 56f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas.

A larvicultura é a fase mais importante no cultivo de peixes, pois ao nascer seu organismo não está totalmente formado e problemas em sua ontogenia acarretarão complicações por toda a vida. Os probióticos têm sido eficientes na modulação do microbioma intestinal a qual interfere na saúde e crescimento das larvas sendo substitutos aos antibióticos. O jundiá é um peixe que se apresenta promissor para ser produzido em larga escala, porém a elevada desuniformidade no crescimento que culmina em canibalismo, dificulta o manejo e aumenta as perdas. Assim, avaliou-se o desempenho, uniformidade e taxa de mortalidade de larvas de jundiá alimentadas com ração contendo diferentes probióticos. Durante 21 dias, larvas de jundiá com 4 dias pós eclosão, 1,00 mg de peso médio e 4,75 mm de comprimento total médio foram cultivadas em 16 aquários totalizando 100 larvas por unidade experimental. A partir de um delineamento inteiramente casualizado, foram testadas as seguintes dietas em quatro repetições: CO: ração controle, sem adição de probiótico; PP: ração com *Pichia pastoris*; SB: ração com *Saccharomyces boulardii* e BT: ração com *Bacillus cereus* var. *toyo*. Dentre os probióticos testados, *Bacillus cereus* var. *toyo* apresentou os melhores resultados, pois ao final da primeira semana as larvas desse tratamento estavam 25% mais pesadas que as do controle e ao final do experimento a diferença aumentou para 28%. Além disso, BT também melhorou a uniformidade e o fator de condição. As larvas alimentadas com *Saccharomyces boulardii* apresentaram menor peso dentre todos os tratamentos. *Pichia pastoris* proporcionou às larvas um crescimento semelhante ao tratamento controle. Portanto, conclui-se que *Bacillus cereus* var. *toyo* melhora o desempenho e a uniformidade de larvas de jundiá e que cerca de 28% da perda de peso nessa fase está ligada à microbiota intestinal, visto que a ação probiótica ocorre no intestino.

Palavras-chave: peixe, microbiota intestinal, *Bacillus cereus* var. *toyo*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

PINTO, Vilson Borba. **Probiotics use in the feed of jundiá larvae (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824)**. 2015. 56f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas.

Larviculture is the more important stage in fish farming, because larva's body is not totally complete to the hatching and the problems in ontogeny will conduce to deficient growth for all life. Probiotics have been efficient in intestinal microbiome modulation which interferes in the health and growth of fish larvae. Jundiá is a fish that presents promissory for intensive farming, although high heterogeneity lead to cannibalism, difficult the handling and increase the lost. Thus, we evaluated the performance, uniformity and mortality rate of the jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae fed with different probiotics. During 21 days jundiá larvae with four days post hatching, 1.00 mg of average body weight and 4.75 mm of total length were farming in 16 glass aquaria, totaling 100 larvae per experimental unit. From a complete randomized design, were tested the following diets in four replicates. CO: control feed, without probiotic; PP: feed with *Pichia pastoris*; SB: feed with *Saccharomyces boulardii* and BT: feed with *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Among tested probiotic, *Bacillus cereus* var. *toyoi* showed the best results, because at the end of the first week, larvae were 25% heavier than CO and at the end of the try the difference increased to 28%. Besides, BT also promoted high uniformity, and Fulton's condition factor. Larvae fed *Saccharomyces boulardii* showed the lowest body weight and those fed *Pichia pastoris* grew similarly to the control diet. Mortality rate was not affected by treatments. Therefore, we concluded that *Bacillus cereus* var. *toyoi* improve the performance and uniformity of the jundiá larvae and that around of 28% of the weight loss in this stage is linked to the intestinal microbiota.

Keywords: fish, intestinal microbiota, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia pastoris*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito de aquários em sistema de recirculação de água.....	28
Figura 2. Unidade experimental.	29
Figura 3. Fígado bovino triturado sendo peneirado.....	30
Figura 4. Mistura dos ingredientes secos e úmidos.	30
Figura 5. Aplicação do hormônio hipofisário de carpa em matriz de jundiá.....	31
Figura 6. Procedimento de contagem das larvas de <i>Rhamdia quelen</i>	32
Figura 7. Incremento no peso das larvas alimentadas com diferentes probióticos aos 7, 14 e 21 dias.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das rações experimentais.....	38
Tabela 2. Desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos aos 7 dias.....	40
Tabela 3. Desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos aos 14 dias.....	40
Tabela 4. Desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos aos 21 dias.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Antibióticos	12
2.2 Probióticos, prebióticos e simbióticos.....	13
2.3 Probióticos na larvicultura	14
2.4 <i>Pichia pastoris</i>	14
2.5 <i>Saccharomyces boulardii</i>	15
2.6 <i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoï</i>	15
3. PROJETO	17
3.1 Caracterização do Problema	18
3.2 Objetivos e Metas.....	20
3.2.1 Gerais	20
3.2.2 Específicos	20
3.3 Metodologia.....	21
3.3.1 Animais e instalações	21
3.3.2 Tratamentos e alimentação	21
3.3.3 Manejo e avaliações de desempenho	22
3.3.4 Avaliações ontogênicas	22
3.3.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	22
3.3.6 Resultados e Impactos esperados.....	23
3.4 Cronograma do Projeto	24
3.5 Aspectos Éticos.....	25
3.6 Referências Bibliográficas.....	26
4. RELATÓRIO DE CAMPO	28
4.1 Local e instalações.....	28
4.2 Confecção das rações.....	29
4.3 Indução à desova e obtenção das larvas	31
5. MANUSCRITO	33

1. INTRODUÇÃO

A larvicultura é sem dúvida a fase mais crítica no cultivo de peixes, pois devido ao organismo não estar completamente formado ao nascer (POWER et al., 2008; RONNESTAD et al., 2013) as larvas são desafiadas por uma série de fatores como a qualidade da água, predadores e doenças.

Considerando que as principais atividades das larvas são comer e evitar ser comida, quanto antes se completar a formação dos órgãos (processo chamado de ontogenia), maiores são as chances de sobrevivência (RONNESTAD et al., 2013). Esse tempo varia de espécie para espécie e pode ser mais moroso caso as condições de alimentação e ambiente não sejam adequadas (AMORIN et al., 2009; LEITÃO et al., 2011; POWER et al., 2008).

Quando inicia a alimentação exógena, as larvas de peixe são expostas a várias desordens da microbiota intestinal (NAYAK, 2010) além da ineficiente digestão das rações (KOLKOVSKI, 2001), porque o sistema imune e digestório não estão totalmente funcionais (RONNESTAD et al., 2013; ZAPATA; CORTÉS, 2008), o que culmina em baixo desempenho e sobrevivência. Sabe-se que o alimento vivo propicia melhor crescimento na fase larval devido à melhor digestão (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001; DIEMER et al., 2012), porém não atua sobre a microbiota intestinal enquanto que os antibióticos atuam nesta e não sobre aquela (MCPHEARSON et al., 1991).

Embora o alimento inerte não tenha se mostrado suficiente para a obtenção dos melhores resultados na larvicultura e aumente a mão de obra devido à elevada frequência alimentar necessária nessa fase, é de fácil obtenção e extremamente necessário para que o organismo da larva se adapte à digestão dos ingredientes que, mais tarde, se tornarão sua principal fonte de nutrientes. Por outro lado, durante

muito tempo os antibióticos foram utilizados como promotores de crescimento pela diminuição da população bacteriana patogênica intestinal (MCPHEARSON et al., 1991), porém devido ao aumento de populações resistentes e aos resíduos acumulados tanto no organismo animal quanto no ambiente (MANZETTI; GHISI, 2014), passou-se a buscar alternativas.

A partir de estudos se verificou que substâncias liberadas por alguns protozoários em seu meio de cultivo promoviam maior crescimento de outros microrganismos e, embora outras denominações tenham sido usadas para o microrganismo produtor da substância estimulante, o termo 'probiótico' surgiu em 1965. Assim, seu significado inicial foi justamente o oposto ao do antibiótico (LILLY; STILLWELL, 1965). Com o passar dos anos observou-se efeito similar aos antibióticos e o significado da palavra 'probiótico' tornou-se mais ampla e, para que não houvesse confusão, FULLER (1989) sugere que probióticos são microrganismos vivos suplementados na alimentação os quais afetam benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço da microbiota intestinal.

Existem várias formas de atuação incluindo inibição de patógenos via produção de compostos antagônicos, competição por sítios de ligação, competição por nutrientes, alteração da atividade enzimática do patógeno, funções imunostimulatórias e aumento da digestibilidade e aproveitamento do alimento pela liberação de enzimas digestivas (KESARCODI-WATSON et al., 2008). E, ao contrário do que muitos pesquisadores buscam, os probióticos não precisam necessariamente colonizar e ser um membro permanente do intestino, desde que tenham pelo menos um modo de ação específico, pois pode ser utilizado um conjunto de microrganismos (KESARCODI-WATSON et al., 2008). Bactérias e leveduras são mais comumente usadas pela facilidade de multiplicação e pelos benefícios já descritos na literatura. *Bacillus cereus* var. *toyoi* e *Saccharomyces cerevisiae* são largamente citados como imuno-moduladores e promotores de crescimento (LARA-FLORES et al., 2003; ABU-ELALA et al., 2013; SCHAREK et al., 2007; SCHIERACK et al., 2007) enquanto que poucos são os dados disponíveis sobre a levedura *Pichia pastoris*.

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) é um peixe que tem distribuição neotropical, do norte do México ao Sul da Argentina. É da ordem dos Siluriformes, caracterizada pela ausência de escamas, presença de barbilhões e

cabeça achatada, sendo os peixes com essas características chamados de bagres. Possui hábito onívoro generalista na natureza, ou seja, alimenta-se de grande variedade de itens de acordo com a disponibilidade (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004; GOMIERO et al., 2007) e dessa forma, aceita bem as rações formuladas com os mais diversos ingredientes. Por ser adaptado ao clima subtropical e possuir características próprias para o processamento industrial (GOMES et al., 2000; GOMIERO et al., 2007), é considerado promissor para a piscicultura da região sul do Brasil.

Pelo exposto, esta pesquisa tem como objetivo avaliar o desempenho, uniformidade e taxa de mortalidade de larvas de jundiá alimentadas com ração suplementada com diferentes tipos de probióticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTIBIÓTICOS

Segundo Manzetti e Ghisi (2014) os antibióticos são usados desde sua descoberta com a “imagem” de ser remédio para inflamações, infecções e doenças. Então, como os animais são susceptíveis a bactérias potencialmente patogênicas como *Escherichia coli* e *Salmonella* ssp., passaram a ser usados como forma preventiva e terapêutica e em doses subterapêuticas como promotores de crescimento (ENGBERG et al., 2000; MCPHEARSON et al., 1991).

Porém, o uso indiscriminado gera uma grande quantidade de metabólitos que, mais cedo ou mais tarde, retornam aos humanos e animais pelo alimento e até mesmo por águas consideradas impenetráveis à contaminação como as subterrâneas (MANZETTI; GHISI, 2014).

McPhearson et al. (1991) avaliaram a resistência das bactérias de diferentes ambientes a alguns antibióticos. Eles relataram que 53,4% das bactérias encontradas no sedimento de tanques de catfish (*Ictalurus punctatus*) historicamente tratados com antibióticos eram resistentes à tetraciclina e 69,1% à oxitetraciclina. Enquanto que, em tanques sem tratamento os valores diminuíram para 14,3 e 25%, respectivamente, sendo os menores índices encontrados em rios, pois apresentaram 0,7 e 0,8%, respectivamente. A problemática é que enquanto houver um mínimo de bactérias resistentes, como no caso dos rios, o uso contínuo dos antibióticos levará as bactérias susceptíveis à morte e, conseqüente, predomínio das sobreviventes pela maior disponibilidade de recursos, visto que a competição diminui.

Esses fatores levaram à proibição do uso de antibióticos e à intensificação da fiscalização por parte das autoridades. Isso acarretou em impacto na produção animal de modo que ativamente passou-se a procurar alternativas (GUNAL et al., 2006) e, para esse fim, os probióticos e prebióticos tem se mostrado promissores.

2.2 PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

A partir de estudos realizados por Lilly e Stillwell (1965) verificou-se que substâncias liberadas por alguns protozoários em seu meio de cultivo promoviam maior crescimento de outros protozoários e, embora diversas denominações tenham sido usadas para o microrganismo produtor da substância estimulante, o termo 'probiótico' surgiu em 1965. Assim, seu significado inicial foi justamente o oposto ao do antibiótico.

Com o passar dos anos observou-se efeito similar aos antibióticos e o significado da palavra 'probiótico' tornou-se mais ampla e, para que não houvesse confusão, Fuller (1989) sugere que probióticos são microrganismos vivos suplementados na alimentação os quais afetam benéficamente o hospedeiro por melhorar o balanço da microbiota intestinal. Por outro lado, os prebióticos são ingredientes não digestíveis pelo hospedeiro, que seletivamente estimulam o crescimento e/ou atividade de um ou limitado número de bactérias no intestino (GIBSON et al., 2004).

O exemplo mais clássico de prebiótico são os mananoligossacarídeos (MOS). Esses açúcares podem ser usados como inibidores da adesão de patógenos às células intestinais, pois a adesão ocorre pela interação das bactérias (via proteína lectina) com grupos de carboidratos específicos presentes na superfície das células. Os MOS resistem à passagem pelo trato gastrointestinal e imitam os grupos de carboidratos específicos das células intestinais favorecendo que as bactérias se liguem a ele e sejam eliminadas via fezes (TORRECILLAS et al., 2014).

Assim, os probióticos são organismos vivos, os prebióticos são ingredientes e os simbióticos a combinação dos dois.

Embora o objetivo inicial do uso dos probióticos fosse substituir os antibióticos apenas no controle das bactérias intestinais, vários outros benefícios foram verificados. Por exemplo, Gunal et al. (2006) relataram que a altura das

vilosidades do intestino de frangos que receberam probiótico foi maior em comparação ao antibiótico. Neste estudo o crescimento foi semelhante entre os tratamentos, o que, segundo aos autores foi devido às condições ambientais estarem ideais de modo que não foi causado nenhum desafio aos animais.

2.3 PROBIÓTICOS NA LARVICULTURA

Segundo Kesarcodi-Watson et al. (2008), existem múltiplas vias nas quais os probióticos podem ser benéficos para os peixes, seja agindo isoladamente ou em combinação com outros. Isso inclui inibição de patógenos via produção de compostos antagônicos, competição por sítios de ligação, competição por nutrientes, alteração da atividade enzimática dos patógenos, funções imunoestimulatórias e benefícios nutricionais como a melhora da digestibilidade e aproveitamento do alimento.

Lobo et al. (2014a,b) relatam vários benefícios do uso da bactéria *Shewanella putrefaciens* na alimentação de larvas de linguado (*Solea senegalensis*). A partir da ingestão diária e colonização do trato gastrointestinal, *S. putrefaciens* promoveu melhor relação de ácidos graxos ômega, maior atividade enzimática digestiva, maior crescimento em peso e comprimento, menor variação nos comprimentos e antecipação da metamorfose.

Mesmo não havendo melhora na sobrevivência no estudos citados, todos os benefícios indicados são altamente desejáveis nessa fase, pois no cultivo em tanques escavados as larvas de peixes estão sujeitas a riscos de toda ordem, uma vez que seus sistemas de locomoção, digestão, nervoso e imune não estão completamente desenvolvidos (PITTMAN et al., 2013; RØNNESTAD et al., 2013).

2.4 PICHIA PASTORIS

A levedura *Pichia pastoris* possui, além de outros fatores, uma alta capacidade de produzir proteínas e, por isso, é o sistema mais efetivo e versátil para a produção de proteínas heterólogas (POTVIN et al., 2012). Na literatura, são encontrados inúmeros trabalhos em que ela é produtora de enzimas como xilanase e fitase sendo os genes provenientes dos mais diversos microrganismos (KARAOGLAN et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2000). Tem funcionado também

como forma de vacinação contra coccidiose uma vez que a proteína responsável pelo reconhecimento do patógeno pelo sistema imune é nela expresso via proteína recombinante (ZHANG et al., 2014).

Além disso, Chen et al. (2000) usaram essa levedura para expressar gene de hormônio do crescimento (GH) recombinante de suíno e com sua inclusão na dieta os animais cresceram mais.

Gil de los Santos et al. (2012) compararam o desempenho de frangos de corte que receberam ração contendo os probióticos *P. pastoris*, *P. pastoris* recombinante *Clostridium perfringens* e *B. cereus* var. *toyo* com uma ração controle. Os autores relataram que a *P. pastoris* que expressou os genes do *Clostridium perfringens* promoveu melhor crescimento e resposta imune enquanto que a comum apresentou desempenho semelhante ao controle.

Assim, *P. pastoris* apresenta várias utilidades e, antes de partir para o uso de genes recombinantes, resta saber se ela na sua forma comum apresenta algum benefício para larvas de jundiá.

2.5 SACCHAROMYCES BOULARDII

Segundo Czerucka et al. (2007), *Saccharomyces boulardii* é naturalmente resistente aos antibióticos e por isso, pode ser prescrita a pacientes sob tratamento com antibióticos. Essa característica permite a recuperação mais rápida, uma vez que Im e Pothoulakis (2010) descrevem que a levedura modifica a expressão da virulência de bactérias e libera enzimas que degradam suas toxinas, além de diminuir a resposta inflamatória.

Abu-Elala et al. (2013) relataram que a *S. cerevisiae* melhorou o crescimento e estímulo da resposta imune não específica de juvenis (80g) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Da mesma forma Waché et al. (2006) também relataram que esta levedura acelerou a maturação do sistema digestório de larvas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) comparado ao grupo controle.

2.6 BACILLUS CEREUS VAR. TOYOI

Bacillus cereus var. *toyo* é uma bactéria que, embora pouco estudada em peixes, tem se mostrado eficiente para estimular o sistema imune de leitões

(SCHAREK et al., 2007; SCHIERACK et al., 2007) e frangos (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012) melhorando o desempenho.

Souza et al. (2012) não observaram diferenças no crescimento de larvas de jundiá (160mg) quando *Bacillus cereus* var. *toyoi* (5×10^8 CFU·ml⁻¹) ou *Saccharomyces boulardii* (2×10^9 CFU·ml⁻¹) foram inoculados na água de cultivo durante 30 dias, no entanto os mesmos autores relataram um efeito inibitório, *in vitro*, desses probióticos sobre *Vibrio carchariae*.

As bactérias, como é o caso do *B. cereus* var. *toyoi*, possuem a capacidade de formar esporos e retornar a forma ativa quando as condições ambientais favorecem (HONG et al., 2005; NICHOLSON et al., 2000). Isso significa que passam com facilidade pelo estômago sem serem degradadas pelo ácido estomacal.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

3. PROJETO

**USO DE PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE
JUNDIÁ, *Rhamdia quelen***

VILSON BORBA PINTO

PELOTAS
OUTUBRO/2014

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A larvicultura é sem dúvida a fase mais crítica no cultivo de peixes, pois mesmo não tendo o organismo completamente formado ao nascer (POWER et al., 2008; RONNESTAD et al., 2013), as larvas são desafiadas por uma série de fatores como a qualidade da água, predadores e doenças. Então, considerando que as principais atividades das larvas são comer e evitar ser comida, quanto antes se completar a formação dos órgãos (ontogenia), maiores são as chances de sobrevivência (RONNESTAD et al., 2013) sendo que esse tempo varia de espécie para espécie e pode ser mais moroso caso as condições de alimentação e ambiente não sejam adequadas (AMORIN et al., 2009; LEITÃO et al., 2011; POWER et al., 2008).

Quando iniciam a alimentação exógena, as larvas de peixe são expostas a várias desordens da microbiota intestinal (NAYAK, 2010) além da ineficiente digestão das rações (KOLKOVSKI, 2001), porque o sistema imune e digestório não estão totalmente funcionais (RONNESTAD et al., 2013; ZAPATA; CORTÉS, 2008), o que culmina em baixo desempenho. Embora o alimento vivo propicie melhor crescimento que a ração por melhorar a digestão, ela é de fácil obtenção e extremamente necessária para que o organismo da larva se adapte à digestão dos ingredientes que, mais tarde, se tornarão sua principal fonte de nutrientes (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001; DIEMER et al., 2012).

Durante muito tempo os antibióticos foram utilizados como promotores de crescimento pela diminuição da população bacteriana patogênica intestinal (MCPHEARSON et al., 1991), porém devido ao aumento de populações resistentes e aos resíduos acumulados tanto no organismo animal quanto no ambiente (MANZETTI; GHISI, 2014), passou-se a buscar alternativas.

A partir de estudos se verificou que substâncias liberadas por alguns protozoários em seu meio de cultivo promoviam maior crescimento de outros e, embora outras denominações tenham sido usadas para o microorganismo produtor da substância estimulante, o termo 'probiótico' surgiu em 1965 e seu significado inicial foi justamente o oposto ao do antibiótico (LILLY; STILLWELL, 1965). Com o passar dos anos observou-se efeito similar aos antibióticos e o significado da palavra

'probiótico' tornou-se mais ampla e, para que não houvesse confusão, FULLER (1989) sugere que probióticos são microrganismos vivos suplementados na alimentação os quais afetam benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço da microbiota intestinal.

Existem várias formas de atuação incluindo inibição de patógenos via produção de compostos antagônicos, competição por sítios de ligação, competição por nutrientes, alteração da atividade enzimática do patógeno, funções imunostimulatórias e aumento da digestibilidade e aproveitamento do alimento pela liberação de enzimas digestivas (KESARCODI-WATSON et al., 2008). E, ao contrário do que muitos pesquisadores buscam, os probióticos não precisam necessariamente colonizar e ser um membro permanente do intestino, desde que tenham pelo menos um modo de ação específico, pois pode ser utilizado um conjunto de microrganismos (KESARCODI-WATSON et al., 2008). Nota-se, portanto, que o alimento vivo auxilia na digestão, mas não na microbiota, que o antibiótico atua na microbiota, mas não na digestão e que o probiótico atua em ambas.

Bactérias e leveduras são mais comumente usadas pela facilidade de multiplicação e pelos benefícios já descritos na literatura. *Bacillus cereus* var. *toyoi* e *Saccharomyces boulardii* são largamente citados como imuno-moduladores e promotores de crescimento (MARTINS et al., 2013; ABU-ELALA et al., 2013; SCHAREK et al., 2007; SCHIERACK et al., 2007) enquanto que poucos são os dados disponíveis sobre a levedura *Pichia pastoris*.

O jundiá é um peixe de hábito bentônico adaptado ao clima subtropical, que se alimenta de uma grande variedade de itens e possui características próprias para o processamento industrial (GOMES et al., 2000; GOMIERO et al., 2007), sendo, portanto, promissor para a piscicultura da região sul do Brasil embora na larvicultura ocorram vários problemas relativos à disparidade de crescimento. Com a heterogeneidade, aumenta o canibalismo principalmente no ambiente de cultivo onde os peixes estão impossibilitados de escapar da predação (BARAS; JOBLING, 2002). Nesse sentido, Lobo et al. (2014) relataram que larvas de *Solea senegalensis* apresentaram menor variação de tamanho quando foi adicionado probiótico na ração.

Pelo exposto, esta pesquisa tem como objetivo avaliar o desempenho de

larvas de jundiá alimentadas com ração contendo diferentes tipos de probióticos.

3.2 OBJETIVOS E METAS

3.2.1 Gerais

Avaliar o desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos

3.2.2 Específicos

Avaliar mudanças morfológicas das larvas no período de ontogenia;

Avaliar o desempenho

Avaliar a sobrevivência;

Avaliar a heterogeneidade do lote

Avaliar o desenvolvimento do trato digestório com diferentes probióticos

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Animais e instalações

As larvas serão obtidas a partir de reprodução induzida realizada no laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas. Logo que iniciarem a alimentação exógena (\pm 4 dias pós eclosão), duas mil larvas serão coletadas e distribuídas ao acaso em 20 bandejas plásticas (100 larvas/bandeja) com dimensões de 19x27,5x7 cm (LxCxA) onde permanecerão por 21 dias. As bandejas possuem o fundo telado (200 micras) e cada uma será suspensa em um aquário de 40L (30x50x27 cm, LxCxA) de modo que permaneça 4 cm submersa. Os aquários, por sua vez, estarão conectados em um sistema fechado de recirculação de água e serão abastecidos por torneiras posicionadas na parte superior para que a água caia dentro da bandeja. Para manter a qualidade da água, a vazão será ajustada semanalmente e o efluente sairá pela parte inferior de cada aquário, sendo conduzida até um filtro biológico.

3.3.2 Tratamentos e alimentação

Será utilizada ração à base de fígado e levedura de cana inativa (CARDOSO et al., 2004) com granulometria de 200-400 μ . A alimentação será fornecida à vontade com intervalos de 2 horas, manualmente das 08:00 às 22:00 e com alimentadores automáticos das 00:00 às 06:00 totalizando 12 refeições diárias.

Serão avaliados, na concentração de 1×10^9 CFU, *Pichia pastoris* (PP), *Saccharomyces boulardii* (SB) e *Bacillus cereus* var. toyoi (BT9) , sendo este último também avaliado na concentração de 1×10^{10} CFU (BT10) além de uma ração controle (CT) em que não será acrescido probiótico.

Os probióticos serão adquiridos no Departamento de Biotecnologia da UFPEL, sendo que sua forma de apresentação será em meio líquido.

Para a confecção das rações, todos os ingredientes serão moídos e peneirados em malha de 100 μ , misturados (inclusive os probióticos quando for o caso), peletizados a frio em moedor de carne e secos em estufa a 37°C por 48 hs.

3.3.3 Manejo e avaliações de desempenho

Diariamente será feita a troca das bandejas sujas por limpas, momento em que será avaliada a ocorrência de mortes, as quais serão anotadas diariamente.

Para a avaliação de peso e comprimento iniciais, antes da contagem, serão realizadas cinco amostragens de dez larvas e, após anestesia com eugenol (20mg/L), cada grupo de larvas será pesado em balança analítica com 3 casas decimais sendo realizada a média de peso em cada grupo. As medidas de comprimento serão realizadas individualmente em papel milimetrado. Aos 7, 14 e 21 dias serão coletadas aleatoriamente 10 larvas de cada aquário e após anestesia serão pesadas e medidas individualmente e logo fixadas em solução de formalina 4% em padrão fosfato 0,1M (pH 7,4) por 6 horas em temperatura ambiente sendo armazenadas em etanol 70% para posterior avaliação do estágio ontogênico.

A partir dos dados de peso e comprimento total (CT), serão avaliados taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (FC), sobrevivência (SOB) e uniformidade do lote (U).

As equações utilizadas serão:

$TCE, \%/dia = 100 \times [(LnPi - LnPf)/dias]$ onde Pi e Pf são peso inicial e peso final, respectivamente;

$$FC = 100 \times Pf/CT^3$$

$SOB, \% = 100 \times Nf/Ni$, onde Nf e Ni equivalem a número final e inicial de larvas, respectivamente.

$U, \% =$ coeficiente de variação da média dado pelo programa estatístico

3.3.4 Avaliações ontogênicas

Para avaliação da ontogenia será realizada análise externa aos 14 e 21 dias a partir da medição da distância da boca até o ânus das larvas amostradas (YAMANO et al., 1991) e análise interna aos 7, 14 e 21 dias a partir de cortes histológicos (4 μ) realizados após fixação em parafina (YANAGIE et al., 2009).

3.3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento será inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições sendo os dados submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, à análise de

variância e comparados pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

3.3.6 Resultados e Impactos esperados

O uso de probióticos poderá acelerar o processo de ontogenia das larvas de jundiá, de modo a melhorar o desempenho, sobrevivência e uniformidade do lote. A produção de maior quantidade de larvas saudáveis e homogêneas permite que sua produção e comercialização sejam aumentadas.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com as recomendações da Resolução nº 1.000 de 12 de maio de 2012, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia e dá outras providências. O projeto será submetido para avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ELALA, N. et al. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v. 1, p.21-29, 2013.
- AMORIN, M.P. et al. Early development of silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**. v. 40, p.172-180, 2009.
- BARAS, E.; JOBLING, M. Dynamics of intracohort cannibalism in cultured fish. **Aquaculture Research**. v.33, p.461-479, 2002.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**. v.200, p.161-180, 2001.
- CARDOSO, A.P. et al. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v.26, n.4, p.457-462, 2004.
- DIEMER, O. et al. *Artemia* sp. na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Animal Brasileira**. v.13, n.2, p.175-179, 2012.
- GOMES, L.C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**. v.30. n.1, p.179-185, 2000.
- GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, vol. 7, n.3, 2007. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/fullpaper?bn01907032007+pt>>. Acesso em: 04 out. 2014.
- KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**. v. 274, p.1-14, 2008.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**. v.200, p.181-201, 2001.
- LEITÃO, N.J. et al. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**. v. 315, p. 78-85, 2011.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**. v. 147, p.747-748, 1965.
- LOBO, C. et al. Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese solea (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**. v. 433, p.183-195, 2014.
- MANZETTI, S.; GHISI, R. The environmental release and fate of antibiotics. **Marine Pollution Bulletin**. v. 79, p. 7-15, 2014.

- MARTINS, F.S. et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against Salmonella infection in mice. **Microbes Infection**. v. 15, p. 270-279, 2013
- MCPHEARSON, R.M. et al. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**. v. 99, p.203-211, 1991.
- NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**. v. 41, p. 1553-1573, 2010.
- POWER, D.M.; SILVA, N.; CAMPINHO, M.A. Metamorphosis. In: FIN, R.N. and KAPOOR, B.G. (Org.). **Fish larval physiology**. Ed. Science Publishers, 2008. p.607-638.
- RØNNESTAD, I. et al. Feeding behavior and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. **Reviews in Aquaculture**. v.5, suppl.1, p.S59-S98, 2013.
- SCHAREK, L. et al. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 120, p.136-147, 2007.
- SCHIERACK, P. et al. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhance systemic immune response in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 118, p. 1-11, 2007.
- YAMANO, K. et al. Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. **Journal of Comparative Physiology part B**. v. 161, p. 371-375, 1991.
- YANAGIE, R. et al. Ontogenic change in tissue osmolality and developmental sequence of mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia developing in freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology part A**. v. 154, p. 263-269, 2009.
- ZAPATA, A.G.; CORTÉS, A. Immunology. In: FIN, R.N.; KAPOOR, B.G. (Org.). **Fish larval physiology**. Ed. Science Publishers, 2008. p.573-604.

4. RELATÓRIO DE CAMPO

4.1 LOCAL E INSTALAÇÕES

A pesquisa foi realizada no laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas. Duas semanas antes da data provável de início do experimento, foi montado o circuito de recirculação de água composto por 16 aquários de vidro, um filtro biológico de fibra de vidro com capacidade de 250L, uma bomba d'água de 0,5 hp e um reservatório de polipropileno de 500L (Figura 1). Em cada aquário foi colocada uma bandeja plástica com fundo telado para limitar a área disponível, diminuir a quantidade de larvas usadas, e facilitar o manejo (Figura 2).



Figura 1. Circuito de aquários em sistema de recirculação de água.



Figura 2. Unidade experimental.

4.2 CONFEÇÃO DAS RAÇÕES

Cinco kg de fígado fresco foram triturados em liquidificador e peneirado (100 μ) para retirada de veias, artérias e tecido conjuntivo (Figura 3). Desse, 4 porções de 1 kg foram separadas sendo que em 3 delas foram adicionados 100 ml da solução com os diferentes probióticos obtidos no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) - Biotecnologia da UFPel. Às quatro porções de fígado foram adicionadas suas respectivas quantidades de lecitina de soja. Paralelamente os ingredientes secos foram misturados e divididos também em quatro porções iguais para então serem misturados com a parte úmida (Figura 4). As misturas referentes às leveduras *Pichia pastoris* e *Saccharomyces boulardii* foram peletizadas e colocadas para secar em estufa a 37°C por 72 horas e as misturas da ração controle e com o probiótico *Bacillus cereus* var. *toyoi* foram congeladas porque essas foram secas a 55°C por 24 horas.



Figura 3. Fígado bovino triturado sendo peneirado.



Figura 4. Mistura dos ingredientes secos e úmidos.

4.3 INDUÇÃO À DESOVA E OBTENÇÃO DAS LARVAS

Alguns animais foram avaliados e então escolhidos duas fêmeas e dois machos para desova. Os fatores observados para seleção das matrizes e reprodutores foram exclusivamente a aptidão para reprodução, não sendo avaliadas características produtivas.

A reprodução foi induzida por aplicação de hormônio hipofisário de carpa na dose de 5mg/kg de fêmea e 2,5mg/kg de macho (Figura 5). As fêmeas possuíam 656g e 788g de peso e ambas com 37 cm de comprimento total.

A água foi mantida a 24°C e as fêmeas desovaram 10 horas a partir da segunda aplicação hormonal, não sendo necessário realizar extrusão dos ovos. A eclosão iniciou 24 horas após a desova e a abertura da boca 72 horas após.

No quarto dia após a eclosão, quando todas as larvas já haviam aberto a boca, iniciou-se a contagem (Figura 6). Grupos de 10 larvas foram separadas em copos plásticos (50 ml) e então o conteúdo de 10 copos eram transferidos para as bandejas dos aquários, totalizando 100 larvas.



Figura 5. Aplicação do hormônio hipofisário de carpa em matriz de jundiá.



Figura 6. Procedimento de contagem das larvas *Rhamdia quelen*.

5. MANUSCRITO

Desempenho de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*, suplementadas com probióticos
Performance of jundiá, *Rhamdia quelen*, larvae fed with probiotics

Vilson Borba Pinto^{1*}, Cristiano Costenaro-Ferreira¹, Paulo Leonardo S. Oliveira¹, Rodrigo R. B. de Oliveira¹, Fernanda Brunner Hammes¹, Sérgio R.N. Piedras¹, Juvêncio L. O. F. Pouey¹

¹ Laboratório de Ictiologia, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, CEP 96010-900, Brazil.

*Autor para correspondência: Laboratório de Ictiologia, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, CEP 96010-900, Brasil. Telefone: +55 53 32757676. E-mail: vilborba@gmail.com

RESUMO

Como os probióticos têm se mostrado como uma alternativa viável ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para animais foi avaliado o desempenho, uniformidade e taxa de mortalidade de larvas de jundiá alimentadas com ração contendo diferentes probióticos. Durante 21 dias, mil e seiscentas larvas de jundiá com 4 dias pós eclosão, 1,00 mg de peso médio e 4,75 mm de comprimento total médio foram cultivadas em 16 aquários totalizando 100 larvas por unidade experimental. A partir de um delineamento inteiramente casualizado, foram testadas as seguintes dietas em quatro repetições: CO: ração controle, sem adição de probiótico; PP: ração com *Pichia pastoris*; SB: ração com *Saccharomyces boulardii* e BT: ração com *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Ao final da primeira semana as larvas do tratamento BT apresentaram peso 25% maior que do CO e ao final do experimento a diferença aumentou para 28%. BT também promoveu melhor uniformidade, mas não afetou a taxa de mortalidade. As larvas alimentadas com SB apresentaram menor peso dentre todos os tratamentos. PP proporcionou às larvas um crescimento semelhante ao tratamento controle. Portanto, conclui-se que *Bacillus cereus* var. *toyoi* melhora o desempenho e a uniformidade de larvas de jundiá e que cerca de 28% da perda de peso nessa fase está ligada à microbiota intestinal.

Palavras-chave: peixe, microbiota intestinal, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

Due to probiotics have showed a viable alternative to the antibiotics as animal growth promoters, we evaluated the performance, uniformity and mortality rate of the jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae fed with different ones. During 21 days 1600 jundiá larvae with four days post hatching, 1.00 mg of average body weight and 4.75 mm of total length were farming in 16 glass aquaria, totaling 100 larvae per experimental unit. From a complete randomized design, were tested the following diets in four replicates. CO: control feed, without probiotic; PP: feed with *Pichia pastoris*; SB: feed with *Saccharomyces boulardii* and BT: feed with *Bacillus cereus* var. *toyoi*. At the end of the first week, BT larvae showed 25% heavier than CO and at the end of the try the difference increased to 28%. BT also promoted high uniformity, but not affected the mortality rate. Larvae fed SB showed the lowest weight among treatments. PP and control diet promoted similar growth. Therefore, we concluded that *Bacillus cereus* var. *toyoi* improve the performance and uniformity of the jundiá larvae and that around of 28% of the weight loss in this stage is linked to the intestinal microbiota.

Keywords: fish, intestinal microbiota, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia pastoris*.

INTRODUÇÃO

Durante muito tempo os antibióticos foram utilizados como promotores de crescimento, porém devido aos seus resíduos na carne, desenvolvimento de bactérias resistentes e acúmulo de seus metabólitos na água e solo, passou-se a buscar alternativas (KESARCODI-WATSON et al., 2008; MANZETTI; GHISI, 2014; MCPHEARSON et al., 1991) como os probióticos e os prebióticos.

Os probióticos, segundo Fuller (1989), são microrganismos vivos suplementados na alimentação que afetam benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço da microbiota intestinal. Já os prebióticos são ingredientes não digestíveis pelo hospedeiro, que seletivamente estimulam o crescimento e/ou atividade de um ou limitado número de bactérias no intestino (GIBSON et al., 2004)

Im e Pothoulakis (2010) descrevem que a levedura *Saccharomyces boulardii* apresenta vários benefícios ao organismo hospedeiro, pois modifica a expressão da virulência de bactérias e libera enzimas que degradam suas toxinas, além de diminuir a resposta inflamatória.

Pichia pastoris é a mais estudada e dinâmica dentre as leveduras, pois tem a capacidade de produzir diversos tipos de proteínas a partir do uso de material genético recombinante de um organismo doador (POTVIN et al., 2012). Apesar disso, não foram encontrados registros de sua utilização como probiótico para peixes nem é citada nas mais recentes revisões bibliográficas do assunto (DIMITROGLOU et al., 2011; IBRAHEM, 2013).

Outro benefício das leveduras é que mesmo mortas, podem apresentar funcionalidade prebiótica, pois sua parede celular é rica em mananoligossacarídeos (AGUILAR-USCANDA; FRANÇOIS, 2003).

Bacillus cereus var. *toyoi* é uma bactéria que, embora pouco estudada em peixes, tem se mostrado eficiente para estimular o sistema imune de leitões (SCHAREK et al., 2007; SCHIERACK et al., 2007) e frangos (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012) melhorando o desempenho.

Estes microrganismos, embora não façam parte da microbiota intestinal, quando ingeridos, protegem a mucosa competindo por nutrientes com as bactérias patogênicas, produzindo substâncias inibitórias (KESARCODI-WATSON et al., 2008) ou ainda estimulando o sistema imune de modo que diminui sua população e quando há a invasão de algum patógeno, a resposta imune não específica é mais rápida (NAYAK, 2010;

PICCHIETTI et al., 2009).

No cultivo em tanques escavados as larvas de peixes estão sujeitas a riscos de toda ordem uma vez que seus sistemas de locomoção, digestão, nervoso e imune não estão completamente desenvolvidos (PITTMAN et al., 2013; RØNNESTAD et al., 2013). Nesse sentido, a partir do momento em que os probióticos auxiliam a diminuir as disfunções intestinais e estimulam o sistema imune, podem permitir que os nutrientes sejam direcionados para completar a ontogenia mais rapidamente, aumentando as chances de sobrevivência.

O jundiá é um bagre adaptado às condições de clima subtropical que apresenta bom crescimento e resistência ao manejo (RADÜNZ E BALDISSEROTTO, 2009) sendo a fase larval um dos principais entraves devido à elevada heterogeneidade que conduz ao canibalismo e baixa sobrevivência (CARNEIRO et al., 2003).

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho, mortalidade e heterogeneidade de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos

MATERIAIS E MÉTODOS

Larvas

As larvas foram obtidas a partir de reprodução induzida realizada no laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas e quatro dias após o nascimento (abertura da boca), mil e seiscentas larvas de jundiá com $1,00 \pm 0,12$ mg e $4,75 \pm 0,46$ mm foram coletadas ao acaso.

Instalações

Dezesseis bandejas plásticas com fundo telado (200micras) e dimensões de $19 \times 27,5 \times 7$ cm (LxCxA) foram suspensas em 16 aquários de 40L ($30 \times 50 \times 27$ cm, LxCxA) de modo que permanecessem 4 cm submersas. Os aquários, por sua vez, estavam conectados em um sistema fechado de recirculação e eram abastecidos pela parte superior para que a água caísse dentro de cada bandeja. A água saía pela parte inferior dos aquários, sendo conduzida até um filtro biológico (350L).

A temperatura foi verificada diariamente pela manhã e à tarde ($25,2 \pm 1,6$) e o oxigênio dissolvido ($7,18 \pm 0,51$ ppm), pH ($7,50 \pm 0,00$), amônia ($0,11 \pm 0,05$ ppm) e nitrito ($0,01 \pm 0,01$ ppm) semanalmente.

O fotoperíodo natural de 14 h de luz foi mantido com incidência indireta sobre os aquários.

Tratamentos e alimentação

Uma dieta à base de fígado bovino e levedura de cana foi formulada de acordo com as recomendações de Cardoso et al. (2004). O fígado fresco foi triturado em liquidificador e peneirado (100 μ) para retirada de veias, artérias e tecido conjuntivo. Em seguida quatro porções de 1 kg foram separadas sendo que em três delas foram adicionados e misturados os diferentes probióticos (Tabela 1) na concentração de 1×10^9 Colony Forming Units (CFU) por grama de ração. Os probióticos foram obtidos no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) – Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

Tabela 1. Composição das rações experimentais.

Ingrediente	Inclusão (%)
Fígado bovino cru ¹	30
Levedura de cana inativada	57
Lecitina de soja	2
Premix vitamínico mineral	11

¹ Valor expresso na matéria seca.

A seguir os outros ingredientes foram adicionados e misturados manualmente seguindo a peletização em moedor de carne formando os seguintes tratamentos: CO: ração controle, sem adição de probiótico; PP: ração com *Pichia pastoris*; SB: ração com *Saccharomyces boulardii*; BT: ração com *Bacillus cereus* var. *toyoi*.

A secagem das rações CO e BT foram realizadas a 55°C por 24h em estufa com circulação de ar. As rações PP e SB foram secas a 37°C por 72h devido ocorrer elevada mortalidade destes probióticos em temperaturas superiores a esta (NWAKA et al., 1994; SHAHSAVARANI et al., 2012). Depois de secas as rações foram moídas e armazenadas em freezer (-18°C). Foram fornecidas às larvas partículas entre 200 e 400 μ .

A alimentação foi fornecida à vontade em intervalos de 2 horas, manualmente das 08:00 às 22:00h e com alimentadores automáticos (BOYU ZW-82) das 00:00 às 06:00h totalizando 12 refeições diárias.

Manejo

As bandejas eram trocadas diariamente para retirada das sobras de ração e fezes, facilitar a renovação da água e contar o número de mortos. Pesagens e tomadas de comprimento foram realizadas aos 7 e 14 dias a partir de uma amostra de 10 larvas e aos 21 dias com uma amostra de 20 larvas de cada aquário, todas coletadas ao acaso e anestesiadas

com eugenol ($20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). As larvas utilizadas nas biometrias do 7º e 14º dia não retornaram para os aquários devido à grande probabilidade de morte.

Parâmetros avaliados

A partir dos dados de peso (mg) e comprimento total (CT, mm), foram calculadas:

IPp, % = incremento no peso entre duas biometrias consecutivas;

ICTp, % = incremento no comprimento entre duas biometrias consecutivas;

K = fator de condição corporal = $100 \times \text{Peso} / \text{CT}^3$;

TCEp, $\% \cdot \text{dia}^{-1}$ = taxa de crescimento específico entre duas biometrias consecutivas = $100 \times [(\text{LnPi} - \text{LnPf}) / \text{dias entre pesagens}]$ onde Pi e Pf são peso inicial e peso no dia, respectivamente;

M, % = Mortalidade = $100 \times (\text{mortos} + \text{retirados para avaliação}) / \text{número inicial de larvas}$;

UP, % = uniformidade no peso = $100 - (100 \times \text{desvio padrão da média do peso} / \text{peso médio})$;

UCT, % = uniformidade no CT = $100 - (100 \times \text{desvio padrão da média do CT} / \text{CT médio})$.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 4 repetições. Após a exclusão dos dados considerados outliers ($\text{média} \pm 2 \times \text{SD}$), todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-wilk e análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância, utilizando o programa estatístico SPSS 8.0.

RESULTADOS

Na primeira semana as larvas do tratamento BT mostraram maior peso, CT, TCE, IPp e ICTp em relação aos outros probióticos ($P < 0,05$), porém não diferiu do CO ($P > 0,05$; Tabela 2).

Aos 14 dias BT promoveu maior peso, CT e K em relação ao PP ($P < 0,05$), porém não diferiu de CO e SB. TCEp, IPp e ICTp foram semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 2. Desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos aos 7 dias.

Variáveis ¹	Tratamentos ²			
	CO	PP	SB	BT
Peso (mg)	7,87 ± 2,00 ^{ab}	5,80 ± 1,7 ^b	5,71 ± 1,86 ^b	9,84 ± 1,38 ^a
CT (mm)	9,29 ± 0,69 ^{ab}	8,31 ± 0,62 ^{bc}	8,08 ± 0,96 ^c	9,64 ± 0,25 ^a
K	0,96 ± 0,10	0,99 ± 0,14	1,06 ± 0,16	1,03 ± 0,09
TCEp (%·dia ⁻¹)	29,07 ± 4,03 ^{ab}	24,58 ± 4,68 ^b	24,20 ± 5,29 ^b	32,56 ± 1,88 ^a
IPp (%)	686,74 ± 200,10 ^{ab}	480,00 ± 170,52 ^b	470,71 ± 186,88 ^b	883,61 ± 137,88 ^a
ICTp (%)	95,56 ± 14,62 ^{ab}	75,03 ± 13,20 ^{bc}	70,01 ± 20,21 ^c	102,98 ± 5,41 ^a

¹ CT = comprimento total; K = fator de condição de Fulton; TCEp = taxa de crescimento específico no período; IPp = incremento no peso no período; ICTp = incremento no comprimento total no período.

² CO = ração controle, sem probiótico; PP = ração com *Pichia pastoris*; SB = ração com *Saccharomyces boulardii*; BT = ração com *Bacillus cereus* var. *toyoi*.

Nota: Cada valor representa a média ± SD (n=10). Os valores com letras diferentes na linha são significativamente diferentes pelo teste de Duncan (P<0,05).

Tabela 3. Desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos aos 14 dias.

Variáveis ¹	Tratamentos ²			
	CO	PP	SB	BT
Peso (mg)	25,31 ± 4,54 ^{ab}	20,13 ± 4,72 ^b	24,61 ± 2,06 ^{ab}	31,69 ± 4,03 ^a
CT (mm)	13,14 ± 0,69 ^{ab}	12,36 ± 0,96 ^b	13,03 ± 0,48 ^{ab}	13,72 ± 0,60 ^a
K	1,11 ± 0,03 ^{ab}	1,05 ± 0,04 ^b	1,11 ± 0,07 ^{ab}	1,23 ± 0,11 ^a
TCEp (%·dia ⁻¹)	16,91 ± 5,47	17,97 ± 7,16	21,52 ± 6,20	16,73 ± 0,98
IPp (%)	247,24 ± 153,46	287,60 ± 203,13	385,34 ± 222,49	223,12 ± 22,88
ICTp (%)	42,04 ± 13,70	49,75 ± 20,69	63,49 ± 24,14	42,48 ± 9,12

¹ CT = comprimento total; K = fator de condição de Fulton; TCEp = taxa de crescimento específico no período; IPp = incremento no peso no período; ICTp = incremento no comprimento total no período.

² CO = ração controle, sem probiótico; PP = ração com *Pichia pastoris*; SB = ração com *Saccharomyces boulardii*; BT = ração com *Bacillus cereus* var. *toyoi*.

Nota: Cada valor representa a média ± SD (n=10). Os valores com letras diferentes na linha são significativamente diferentes pelo teste de Duncan (P<0,05).

Na terceira semana, as larvas alimentadas com BT apresentavam maior peso, K e UCT em relação aos demais tratamentos (P < 0,05). BT também promoveu maior CT em relação aos outros probióticos e UP em comparação a CO (P < 0,05). Já os parâmetros que indicam o crescimento nesta última semana de avaliação (TCEp, IPp e ICTp) foram semelhantes (P > 0,05; Tabela 4) e o K foi maior em BT.

A taxa de mortalidade não foi afetada pelos tratamentos (P > 0,05).

Tabela 4. Desempenho de larvas de jundiá alimentadas com diferentes probióticos aos 21 dias.

Variáveis ¹	Tratamentos ²			
	CO	PP	SB	BT
Peso (mg)	76,92 ± 1,80 ^b	61,72 ± 6,55 ^{bc}	60,00 ± 14,79 ^c	98,97 ± 13,22 ^a
CT (mm)	19,26 ± 0,30 ^{ab}	18,09 ± 0,66 ^b	17,95 ± 1,41 ^b	20,11 ± 1,00 ^a
K	1,08 ± 0,05 ^b	1,04 ± 0,02 ^b	1,02 ± 0,04 ^b	1,21 ± 0,06 ^a
TCEp (%·dia ⁻¹)	16,05 ± 2,50	16,28 ± 4,75	12,41 ± 3,05	16,25 ± 1,51
IPp (%)	211,23 ± 54,76	226,02 ± 111,74	142,31 ± 46,95	213,33 ± 34,56
ICTp (%)	47,04 ± 9,88	47,22 ± 15,97	37,65 ± 6,72	46,60 ± 4,20
UP (%)	42,64 ± 11,51 ^b	51,11 ± 9,27 ^{ab}	51,45 ± 4,50 ^{ab}	57,77 ± 7,50 ^a
UCT (%)	82,75 ± 0,67 ^b	83,30 ± 1,09 ^b	82,10 ± 0,66 ^b	85,41 ± 2,17 ^a
M (%)	23,50 ± 2,88	23,25 ± 2,21	23,75 ± 1,70	23,25 ± 0,50

¹ CT = comprimento total; K = fator de condição de Fulton; TCEp = taxa de crescimento específico no período; IPp = incremento no peso no período; ICTp = incremento no comprimento total no período; UP = uniformidade dos pesos; UCT = uniformidade dos comprimentos totais; M = mortalidade.

² CO = ração controle, sem probiótico; PP = ração com *Pichia pastoris*; SB = ração com *Saccharomyces boulardii*; BT = ração com *Bacillus cereus* var. *toyoi*.

Nota: Cada valor representa a média ± SD (n=20). Os valores com letras diferentes na linha são significativamente diferentes pelo teste de Duncan (P<0,05).

DISCUSSÃO

Durante a fase mais recente do desenvolvimento de todos os peixes ósseos, a nutrição inicia a partir do saco vitelino originado do ovo. Nesse momento o intestino é um tubo reto e indiferenciado que se desenvolve simultaneamente com o uso do vitelo e início da alimentação exógena (POWER et al., 2008).

Segundo Nayak (2010), a colonização do trato gastrointestinal (TGI) dos peixes é significativa após o início da alimentação exógena e, dependendo dos microrganismos presentes no meio, podem ocorrer perdas de peso devido a disfunções intestinais. No presente estudo as larvas do BT foram mais pesadas que as do PP e SB já na primeira semana além de, embora estatisticamente semelhante, estarem 25% mais pesadas que CO.

É importante salientar que esse desempenho inicial foi determinante para que ao final do teste, as larvas do BT estivessem 28% mais pesadas que o CO, visto que tanto aos 14 quanto aos 21 dias o IPp foi semelhante entre os tratamentos (Figura 7). Assim, 89% do acréscimo de peso causado por BT ocorreu nos primeiros sete dias, o que denota a importância da modulação da microbiota nesse período.

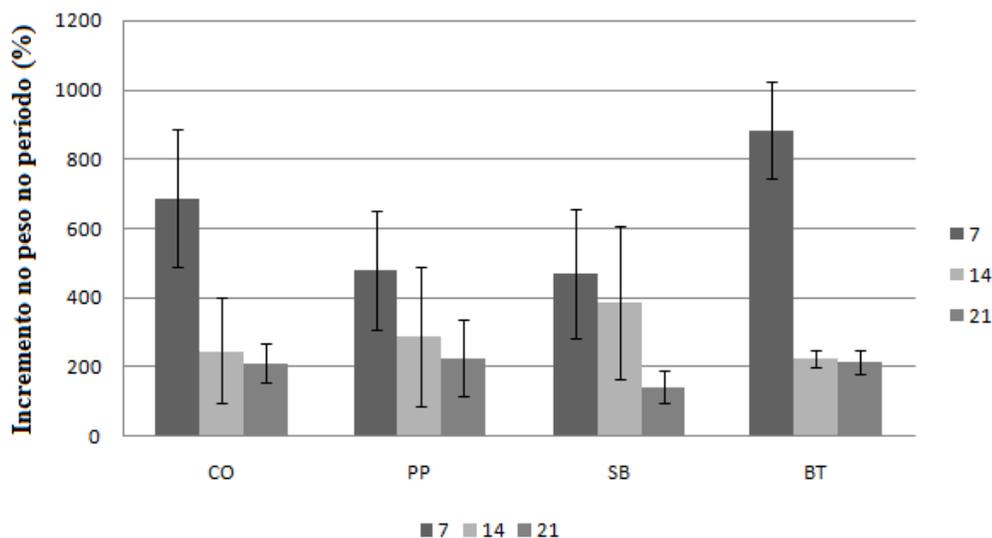


Figura 7. Incremento no peso das larvas alimentadas com diferentes probióticos aos 7, 14 e 21 dias. CO: ração controle, sem probiótico; PP: ração com *Pichia pastoris*; SB: ração com *Saccharomyces boulardii*; BT: ração com *Bacillus cereus* var. *toyoi*.

Embora os microrganismos presentes no meio afetem a população microbiana intestinal, Souza et al. (2012) não observaram diferenças no crescimento de larvas de jundiá (160mg) quando *Bacillus cereus* var. *toyoi* (5×10^8 CFU·ml⁻¹) ou *Saccharomyces boulardii* (2×10^9 CFU·ml⁻¹) foram inoculados na água de cultivo durante 30 dias, no entanto os mesmos autores relataram um efeito inibitório, *in vitro*, desses probióticos sobre *Vibrio carchariae*.

O desempenho das larvas do tratamento CO foi superior ao encontrado por Cardoso et al. (2004) que obtiveram larvas com 61,68 mg aos 21 dias quando alimentadas com ração contendo fígado de aves em comparação ao fígado bovino.

Ao observar as variações no K dos tratamentos, observa-se que na primeira semana todos os tratamentos mantiveram valores próximos a 1 (um), o que indica que o crescimento em peso e comprimento foi sincrônico. Na segunda semana e terceira semana o K do BT manteve-se em torno de 1,2 devido ao ganho em peso ter sido mais pronunciado que o comprimento. Isso indica que a ontogenia dos órgãos internos estava mais avançada nesse tratamento. Palermo et al. (2011) apontaram que o uso do probiótico *Enterococcus faecium* aumentou os níveis do cortisol plasmático de larvas de *Solea solea* e que isso tem a função da manutenção da homeostase da glicose durante o desenvolvimento e embriogênese. Além disso, Yamano et al. (1991) descreveram que o cortisol potencializa os efeitos dos hormônios tireoidianos sobre a metamorfose.

Ao avaliar o conjunto UP e UCT, o tratamento BT apresentou os melhores resultados. Efeito similar foi relatado por Gisbert et al. (2013) que verificaram menor heterogeneidade em alevinos de truta arco-íris (2,8 g) suplementadas com *B. cereus* var. *toyoi* por 93 dias. Os autores sugerem ainda que a inclusão do probiótico tem uma importância prática, devido reduzir as situações de dominância hierárquica exercida pelos indivíduos maiores.

As duas leveduras testadas apresentaram resultados inferiores ao CO. Porém, Abu-Elala et al. (2013) relataram que a *S. cerevisiae* melhorou o crescimento e estímulo da resposta imune não específica de juvenis (80g) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Da mesma forma Waché et al. (2006) também relataram que esta levedura acelerou a maturação do sistema digestório de larvas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) comparado ao grupo controle.

Por outro lado, Gil de los Santos et al. (2012) compararam o desempenho de frangos de corte que receberam ração contendo os probióticos *P. pastoris*, *P. pastoris* recombinante *Clostridium perfringens* e *B. cereus* var. *toyoi* com uma ração controle. Os autores descreveram que os animais que receberam *P. pastoris* tiveram crescimento semelhante ao controle enquanto os demais mostraram melhor desempenho.

Abu-Elala et al. (2013) e Waché et al. (2006) utilizaram gelatina e óleo de fígado de bacalhau, respectivamente, como forma de incorporar as leveduras na ração pronta. Assim, uma hipótese para as larvas do PP e SB apresentarem peso 24 e 28% menor que o CO, respectivamente, é que pode ter ocorrido a morte dos microrganismos durante o processamento, pois a temperatura da ração aumentou consideravelmente quando foi submetida à pressão na peletização. Além disso, a associação da umidade da ração com a temperatura de secagem (37°C) pode ter desenvolvido outras bactérias que afetaram sua qualidade.

Essa dificuldade de manter a sobrevivência das leveduras as torna de difícil aplicação, pois no processamento industrial, dificilmente será possível manter a temperatura abaixo da letal, visto que o processo de extrusão ocorre entre 80 e 200°C (GOELEMA, 1999).

Por outro lado, as bactérias como é o caso do *B. cereus* var. *toyoi*, possuem a capacidade de formar esporos e retornar a forma ativa quando as condições ambientais favorecem (HONG et al., 2005; NICHOLSON et al., 2000).

De modo geral, os resultados do presente estudo são semelhantes aos obtidos com outras espécies. Avella et al. (2011) avaliaram o efeito do uso da bactéria *E. faecium* como probiótico na larvicultura de *S. solea* e relataram aumento no crescimento, porém sem

diferença na sobrevivência. Da mesma forma Lobo et al. (2014) observaram que o probiótico *Shewanella putrefaciens* melhorou o desempenho, homogeneidade, mas não afetou a sobrevivência de *S. senegalensis*.

CONCLUSÕES

Conclui-se que *Bacillus cereus* var. *toyoi* melhora o desempenho e a homogeneidade de larvas de jundiá e que cerca de 28% da perda de peso nessa fase está ligada à microbiota intestinal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas pelo fornecimento dos probióticos e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de estudos fornecida ao segundo autor.

REFERÊNCIAS

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, p. 21-29, 2013.

AGUILAR-USCANDA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 268-274, 2003.

AVELLA, M. A.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; RIBECCO, C.; CRESCI, A.; PALERMO, F.; POLZONETTI, A.; CARNEVALI, O. Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. **Aquaculture**, v. 315, p. 384-393, 2011.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Ed. UFSM, 2004.

CARDOSO, A.P.; RADÜNZ NETO, J.; MEDEIROS, T.S.; KNÖPKER, M.A.; LAZZARI, R. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. **Acta Scientiarum. Animal Science**, v. 26, n. 4, p. 457-462, 2004

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA-FILHO, P. R. C.; BENDHACK, F. Live and formulated diet evaluation through initial growth and survival of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 615-619, 2003.

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

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

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 448-451, 2012.

GISBERT, E.; CASTILLO, M.; SKALLI, A.; ANDREE, K. B.; BADIOLA, I. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota in rainbow trout fingerlings. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2766-2774, 2013.

GOELEMA, J. O. **Processing of legume seed: effects on digestive behaviors in dairy cows.** 1999. p. 221.

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

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. **Journal of Advanced Research**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004>, 2013.

IM, E.; POTHOUKAKIS, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34, suppl. 1, p. S62-S70, 2010.

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

LOBO, C.; MORENO-VENTAS, X.; TAPIA-PANIAGUA, S.; RODRÍGUEZ, C.; MORIÑIGO, M. A.; LA BANDA, I. G.; Dietary probiotic supplementation (*Shewanella*

putrefaciens Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 295-309, 2014.
MANZETTI, S.; GHISI, R. The environmental release and fate of antibiotics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 79, p. 7-15, 2014.

MCPHERSON, R. M.; DEPAOLA, A.; ZYWNO, S. R.; MOTES JR, M. L.; GUARINO, A. M. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultures catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 99, p. 203-211, 1991.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1553-1573, 2010.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572.

NWAKA, S.; KOPP, M.; BURGERT, I.; DEUHLER, I.; KIENLE, I.; HOLZER, H. Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? **FEBS Letters**, v. 344, p. 225-228, 1994.

PALERMO, F. A.; MOSCONI, G.; AVELLA, M. A.; CARNEVALI, O.; VERDENELLI, M. C.; CECCHINI, C.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1^a, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, p. 293-300, 2011.

PICCHIETTI, S.; FAUSTO, A. M.; RANDELLI, E.; CARNEVALLI, O.; TADDEI, A. R.; BUONOCORE, F.; SACAPIGLIATI, G.; ABELLI, L. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.), **Fish Shellfish Immunology**, v. 26, p. 368-376, 2009.

PITTMAN, K.; YÚFERA, M.; PAVLIDIS, M.; GEFFEN, A.J.; KOVEN, W.; RIBEIRO, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; TANDLER, A. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, suppl. 1, p. S224-S267, 2013.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z.; Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.

POWER, D.M.; SILVA, N.; CAMPINHO, M.A. **Metamorphosis**. In: Fin, R.N., Kapoor,

B.G. (Eds.), Fish larval physiology. Science Publishers, New Hampshire, USA, 2008. p. 607-638.

RØNNESTAD, I.; YÚFERA, M.; UEBERSCHÄR, B.; RIBEIRO, L.; ØYSTEIN, S.; BOGLIONE, C. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, suppl. 1, p. S59-S98, 2013.

SCHAREK, L.; ALTHERR, B. J.; TÖLKE, C.; SCHMIDT, M. F. G. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 120, p. 136-147, 2007.

SCHIERACK, P.; WIELER, L. H.; TARAS, D.; HERWIG, V.; TACHU, B.; HLINAK, A.; SCHMIDT, M. F. G.; SCHAREK, L. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhance systemic immune response in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 1-11, 2007.

SHAHSAVARANI, H.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; CHUENCHIT, B.; HARASHIMA, S. Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of RSP5 ubiquitin ligase. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1289-1300, 2012.

SOUZA, D. M.; MARTINS, G. B.; PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F.; ROBALDO, R. B.; LEITE, F. P. L. Probiotic actions of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* in silver catfish (*Rhamdia quelen*) larvae culture. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p.815-819, 2012.

WACHÉ, Y.; AUFRAY, F.; GATESOUBE, F. J.; ZAMBONINO, J.; GAYET, V.; LABBÉ, L.; QUENTEL, C. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, fry. **Aquaculture**, v. 258, p. 470-478, 2006.

YAMANO, K.; TAGAWA, M.; de JESUS, E. G.; HIRANO, T.; MIWA, S.; INUI, Y. Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. **Journal of Comparative Physiology, part B**, v. 161, p. 371-375, 1991.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa pesquisa foi realizada com o principal propósito de avaliar o desempenho de larvas de jundiá que receberam diferentes tipos de probióticos na alimentação, no entanto o trabalho envolveu não somente a parte experimental, mas também um conjunto de atividades que necessitaram ser realizadas antes e depois do experimento.

O estímulo à desova envolveu conhecimentos básicos sobre reprodução como o uso de hormônio hipofisário e suas dosagens de aplicação em machos e fêmeas, bem como o momento da aplicação do hormônio e cálculo do provável momento da desova. Além disso, a confecção das rações exigiu constantes adaptações devido aos seus elevados teores de umidade e limites máximos de temperatura suportados pelas leveduras.

O acompanhamento do desenvolvimento das larvas permitiu verificar na prática a grande heterogeneidade de crescimento da espécie que é constantemente relatada na literatura. As técnicas de controle da qualidade da água, métodos de medição e pesagem e acompanhamento do crescimento também foram vivenciados.

Enfim, apesar das dificuldades, todo o conhecimento adquirido e aplicado na realização deste trabalho culminou em pelo menos um grande resultado além da realização pessoal: o *Bacillus cereus* var. *toyoi* é um probiótico promissor e quando fornecido às larvas de jundiá misturado na ração durante a fase inicial, incrementa 28% seu crescimento.

REFERÊNCIAS

- ABU-ELALA, N. et al. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v. 1, p.21-29, 2013.
- AGUILAR-USCANDA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 268-274, 2003.
- AMORIN, M.P. et al. Early development of silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**. v. 40, p.172-180, 2009.
- AVELLA, M. A. et al. Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. **Aquaculture**, v. 315, p. 384-393, 2011.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Ed. UFSM, 2004.
- BARAS, E.; JOBLING, M. Dynamics of intracohort cannibalism in cultured fish. **Aquaculture Research**. v.33, p.461-479, 2002.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**. v.200, p.161-180, 2001.
- CARDOSO, A.P. et al. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v.26, n.4, p.457-462, 2004.
- CARNEIRO, P. C. F. et al. Live and formulated diet evaluation through initial growth and survival of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 615-619, 2003.
- DIEMER, O. et al. *Artemia* sp. na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Animal Brasileira**. v.13, n.2, p.175-179, 2012.
- DIMITROGLOU, A. et al. Microbial manipulations to improve fish health and production A Mediterranean perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, p. 1-16, 2011.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66,

p. 365-378, 1989.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIL DE LOS SANTOS, J. R. et al. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 448-451, 2012.

GISBERT, E. et al. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota in rainbow trout fingerlings. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2766-2774, 2013.

GOELEMA, J. O. **Processing of legume seed: effects on digestive behaviors in dairy cows**. 1999. p. 221.

GOMES, L.C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**. v.30. n.1, p.179-185, 2000.

GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, vol. 7, n.3, 2007. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/fullpaper?bn01907032007+pt>>. Acesso em: 04 out. 2014.

GUNAL, M. et al. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **International Journal of Poultry Science**. v. 5, n. 2, p. 149-155, 2006.

HONG, H. A. et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. **Journal of Advanced Research**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004>, 2013.

IM, E.; POTHOUKAKIS, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34, suppl. 1, p. S62-S70, 2010.

KARAOGLAN, M. et al. Screening of signal sequences for extracellular production of *Aspergillus niger* xylanase in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 92, p. 16-21, 2014.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**. v. 274, p.1-14, 2008.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**. v.200, p.181-201, 2001.

LEITÃO, N.J. et al. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**. v. 315, p. 78-85, 2011.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by

microorganisms. **Science**. v. 147, p.747-748, 1965.

LOBO, C. et al. Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese solea (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**. v. 433, p.183-195, 2014a.

LOBO, C. et al. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 295-309, 2014b.

MANZETTI, S.; GHISI, R. The environmental release and fate of antibiotics. **Marine Pollution Bulletin**. v. 79, p. 7-15, 2014.

MARTINS, F.S. et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against Salmonella infection in mice. **Microbes Infection**. v. 15, p. 270-279, 2013

MCPHEARSON, R.M. et al. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**. v. 99, p.203-211, 1991.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**. v. 41, p. 1553-1573, 2010.

NICHOLSON, W. L. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572.

NWAKA, S. et al. Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? **FEBS Letters**, v. 344, p. 225-228, 1994.

PALERMO, F. A. et al. Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1^a, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, p. 293-300, 2011.

PICCHIETTI, S. et al. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.), **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 368-376, 2009.

PITTMAN, K. et al. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, suppl. 1, p. S224-S267, 2013.

POTVIN, G. et al. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.

POWER, D.M.; SILVA, N.; CAMPINHO, M.A. Metamorphosis. In: FIN, R.N. and KAPOOR, B.G. (Org.). **Fish larval physiology**. Ed. Science Publishers, 2008. p.607-638.

RODRIGUEZ, E.; MULLANEY, E. J.; LEI, X. G. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, p.373-

378, 2000.

RØNNESTAD, I. et al. Feeding behavior and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. **Reviews in Aquaculture**. v.5, suppl.1, p.S59-S98, 2013.

SCHAREK, L. et al. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 120, p.136-147, 2007.

SCHIERACK, P. et al. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhance systemic immune response in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 118, p. 1-11, 2007.

SHAHSAVARANI, H. et al. Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of RSP5 ubiquitin ligase. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1289-1300, 2012.

SOUZA, D. M. et al. Probiotic actions of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* in silver catfish (*Rhamdia quelen*) larvae culture. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p.815-819, 2012.

TORRECILLAS, S. et al. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 36, p. 525-544, 2014.

WACHÉ, Y. et al. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, fry. **Aquaculture**, v. 258, p. 470-478, 2006.

YAMANO, K. et al. Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. **Journal of Comparative Physiology part B**. v. 161, p. 371-375, 1991.

YANAGIE, R. et al. Ontogenic change in tissue osmolality and developmental sequence of mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia developing in freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology part A**. v. 154, p. 263-269, 2009.

ZAPATA, A.G.; CORTÉS, A. Immunology. In: FIN, R.N. and KAPOOR, B.G. (Org.). **Fish larval physiology**. Ed. Science Publishers, 2008. p.573-604.