



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Augusto Cesar dos Santos Queiroz

**Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápia nilótica
(*Oreochromis niloticus*) alimentada com ração suplementada com
levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

PETROLINA-PE
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Augusto Cesar dos Santos Queiroz

**Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápia nilótica
(*Oreochromis niloticus*) alimentada com ração suplementada com
levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Co-orientadora: Dr. Gisele Veneroni

Gouveia

PETROLINA-PE
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Augusto Cesar dos Santos Queiroz

**Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápia nilótica
(*Oreochromis niloticus*) alimentada com ração suplementada com
levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dra. Josir Laine Aparecida Veschi
EMBRAPA Semi árido

Prof. Dr. Álvaro José de Almeida Bicudo
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UAG

Petrolina, Julho de 2012.

A minha família e amigos que acreditaram em mim...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo suporte e por sempre acreditarem em mim, qualquer que fosse o meu foco. E minha irmã por ser minha eterna defensora, pois só ela pode me criticar.

Ao Professor Doutor Mateus Mattiuzzi da Costa, por me acolher no momento mais complicado, pela compreensão e orientação.

A todos os integrantes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF. Maria da Conceição, Izabela, Gisele pelo apoio diário e ensinamentos.

Um agradecimento em especial para Renilde e Samira que me acompanharam desde o começo do Mestrado, ajudando na escrita de projetos e experimentos.

Ao inestimável Professor Msc. Ricardo Nogueira, pelo auxílio no transporte de peixes e produtos para confecção de rações.

Agradeço aos meus amigos e amigas: Adriano, Irenice, Cleidson, Iraelson, Adílio, Washington, que me ajudaram de várias formas para o cumprimento desta minha fase. No final da trilha, os nossos amigos são nossa família.

A Codevasf e seus funcionários: Liege, Marcelo, Inácio, especialmente, ao amigo Rozzano por sempre estar disponível.

Aos familiares que sempre estiveram comigo nos pensamentos positivos: Tio Pádua, Jô, Tio Ângelo, Andréia, Nenena, Juarez, João Paulo, Denira, Silvio, João Paulo, Ana Rafaela, Ana Carolina, Rafael. Família é a base, juntos sempre seremos mais fortes.

A Ceíça, Naedja, Karen, Fátima e Laíse pelo suporte no experimento e a Prof. Dra. Keila Batista por ceder materiais para análise de amostras.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal por permitir a conclusão desta etapa tão importante em minha vida.

INOCULAÇÃO DE *Aeromonas Hydrophila* EM TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMO

A tilápia, por ser um peixe com excelente desempenho zootécnico e características organolépticas, é o peixe mais cultivado no Brasil e na Região do Vale do São Francisco. Sendo cultivado de forma intensiva, este animal sofre estresse pelo manejo e debilita seu sistema imunológico, especialmente no período de clima frio que, além de diminuir seu metabolismo e a ingestão de alimento, favorece a proliferação de bactérias. A bactéria *Aeromonas hydrophila* é uma das principais causadoras de mortalidade na piscicultura brasileira, sendo a mortalidade provocada por esta bactéria prevenida pela utilização de antibióticos, o que não é sustentável. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na fabricação de álcool, fermentação de cerveja e pão, tem sido apontada como excelente probiótico para peixes por atuar como promotor de crescimento e melhorar a imunologia. Assim, esta pesquisa teve por finalidade analisar o desempenho zootécnico e a resposta imunológica da tilápia, *Oreochromis niloticus*, alimentada por 30 dias com ração suplementada com levedura, *S. cerevisiae*. Em seguida os animais foram desafiados com inoculação de bactéria *A. hydrophila* em uma concentração de 10^8 UFC/ml/peixe, sendo o inóculo injetado na região dorso-lateral esquerdo do animal. Foram utilizados 120 alevinos de tilápia com peso médio de $12,83 \pm 0,12$ g, distribuídos, em homogeneidade de peso, em 20 aquários de 60 litros em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os níveis de inclusão de *S. cerevisiae* na ração foram de 0/SS (inoculação de solução salina), 0/Ah (inoculação de *A. hydrophila*), 10^3 /Ah, 10^5 /Ah e 10^7 /Ah por quilo de ração. Ao final do experimento foram obtidos dados relativos ao desempenho zootécnico (peso médio, ganho de peso, taxa de crescimento específico, sobrevivência e conversão alimentar aparente), dados hematológicos (hematócrito, hemoglobina, leucócito, eritrócito, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio e glicose) e colonização da bactéria na água e da levedura na água e no intestino. Tanto para os parâmetros de desempenho como os hematológicos não mostraram diferença significativa entre os tratamentos. Não houve mortalidade no tratamento controle com inoculação de solução salina. A concentração de 10^8 UFC/ml/peixe de bactéria inoculada causou mortalidade de 100% dos peixes. Foi observada a colonização *A. hydrophila* na água e de *S. cerevisiae* no intestino, mas não houve colonização deste último na água. Estes resultados indicam que a levedura *S. cerevisiae* não funcionou como promotor de crescimento e nem causou resistência imunológica a inoculação bacteriana. Supõe-se que a concentração de bactéria utilizada como desafio sanitário esteja acima do DL50 para o peso médio dos peixes estudados, tornando-se assim necessário, mais estudos utilizando concentrações de *A. hydrophila* menores.

Palavras chave: tilápia, probiótico, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aeromonas hydrophila*.

INOCULATION OF AEROMONAS HYDROPHILA IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) FED DIETS SUPPLEMENTED WITH YEAST *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Tilapia, a fish for being with excellent performance and organoleptic characteristics, is the most cultivated fish in Brazil and Vale of São Francisco. Being cultivated intensively, this animal is stressed by handling and weakens your immune system, especially during cold weather, and lower your metabolism and food intake, promotes Proliferating bacteria. The bacterium *Aeromonas hydrophila* is one of the leading causes of mortality in aquaculture, is currently prevented by the use of antibiotics, which is not sustainable. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, used in fabricação alcohol, beer brewing and bread, has been identified as an excellent probiotic for fish to act as a growth promoter and improve immunology. Thus, this research aims at examining the performance and immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed for 30 days with diets supplemented with yeast, *S. cerevisiae*. Then the animals were challenged with inoculation of bacteria *A. hydrophila* at a concentration of 108 CFU / ml / fish, the inoculum was injected into the left lateral dorsal region of the animal. A total of 120 tilapia fingerlings with average weight of 12.83 ± 0.12 g, distributed, uniformity of weight, 20 tanks of 60 liters in experimental casualidade, with five treatments and four replications. The inclusion levels of *S. cerevisiae* in the diet of 0/SS (injection of saline) 0/Ah (inoculation of *A. hydrophila*) 10^3 / Ah and 105/Ah 107/Ah per kg of diet. At the end of the experiment were obtained from data on animal performance (weight, weight gain, specific growth rate, survival and feed conversion), hematological (hematocrit, hemoglobin, leukocytes, erythrocytes, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume and glucose) and colonization of the bacteria in water and yeast in water and in the intestine. For both performance parameters such as hematology showed no significant difference between treatments. There was no mortality in the control treatment inoculated with saline. The concentration of 108 CFU / ml / fish inoculated bacteria caused 100% mortality of the fish. It was observed colonization *A. hydrophila* water and *S. cerevisiae* in the intestine but there was no colonization of the water. These results indicate that the yeast *S. cerevisiae* did not work as a promoter of growth and caused no immunological resistance to bacterial inoculation. Supeita that the concentration of bacteria used as sanitary challenge is above the LD50 for the average weight of fish studied, making it necessary, further studies using concentrations of *A. hydrophila* smaller.

Keywords: tilapia, probiotic, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aeromonas hydrophila*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da disposição dos aquários e bombas de aeração, mostrando o experimento em delineamento inteiramente casualizado.
- Figura 2.** Coleta de sangue através da veia caudal.
- Figura 3.** Abertura do abdômen para coleta do intestino.
- Figura 4.** Maceração do intestino.
- Figura 4.** Cultivo de *A. hydrophila* em meio TSA para preparação do inóculo.
- Figura 5.** Mistura de *A. hydrophila* em solução salina.
- Figura 6.** Escala de Mc Farland padrão para a concentração de 10^8 UFC/ml.
- Figura 7.** Inoculação 1 ml de inóculo de *A. hydrophila*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bromatologia da ração informada pelo fabricante (Purina).

Tabela 2. Enriquecimento mineral da ração informada pelo fabricante (Purina).

Tabela 3. Enriquecimento vitamínico da ração informada pelo fabricante (Purina).

Tabela 4. Valores médios de desempenho zootécnico de alevinos de tilápia alimentados com as diferentes concentrações de *S. cerevisiae* na ração.

Tabela 5. Valores médios de parâmetros hematológicos de alevinos de tilápia alimentados com as diferentes concentrações de *S. cerevisiae* na ração.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1 Tilápia Nilótica.....	16
2.2 Probióticos na Aquicultura.....	18
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.4 <i>Aeromonas hydrophila</i>	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAI E MÉTODOS	23
4.1 Local	23
4.2 Procedência de <i>S. cerevisiae</i> e <i>A. hydrophila</i>	23
4.3 Animais Experimentais.....	23
4.4 Unidade Experimental	24
4.5 Confeção das Rações	24
4.6 Tratamentos.....	26
4.7 Layout	27
4.8 Manejo	28
4.9 Desempenho Zootécnico	28

4.10 Coleta de Sangue	29
4.11 Análise da Microbiota Intestinal.....	29
4.12 Análise microbiológica da água.....	29
4.13 Desafio Sanitário com <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
4.14 Identificação Bacteriana	30
4.15 Análise de Células Vermelhas do sangue.....	30
4.15.1 Hematimetria.....	30
4.15.2 Leucometria Total	30
4.15.3 Volume Globular (VG).....	31
4.15.4 Volume Corpuscular Médio.....	31
4.15.5 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	31
4.16 Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Qualidade de água.....	32
5.2 Desempenho zootécnico.....	32
5.3 Hematologia.....	34
5.4 Mortalidade	35
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a FAO (2010), a produção mundial de pescados em 2009 foi de 145,1 milhões de toneladas, sendo 90 e 55,1 milhões de toneladas da pesca por captura e aquicultura, respectivamente. A China se mantém como maior produtor de pescados contabilizando 47,5 milhões de toneladas (32,7 e 14,8 milhões de toneladas da aquicultura e pesca por captura, respectivamente). O Brasil aparece em 21º lugar no ranking mundial com produção total de pescados de 1,15 milhões de toneladas (791 e 415 mil toneladas da pesca por captura e aquicultura, respectivamente).

A pesca estagnada associada ao rápido crescimento populacional gera maior demanda por alimento, principalmente em relação à proteína animal mais saudável. Assim a solução desta situação é o cultivo de pescados em cativeiro tanto no continente quanto no mar, definindo-se assim, aquicultura continental e aquicultura marinha, respectivamente.

Aquicultura é definida pelo cultivo de organismos aquáticos naturais de ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos, que tenham seu desenvolvimento parcial ou total vinculado a estes ambientes. Desta forma, a aquicultura engloba o cultivo de microalgas, algas, microcrustáceos, crustáceos, moluscos, rãs, quelônios, peixes, jacarés, entre outros. Desses diversos organismos cultivados, surgem muitos nomes relativos ao cultivo dos mesmos, como: algicultura (algas), carcinicultura (crustáceos), malacocultura (moluscos), ranicultura (rã), piscicultura (peixe), crocodilicultura (jacaré).

Mundialmente, o cultivo de organismos aquáticos com fins comerciais, ficou conhecido através da criação de peixe (carpa, *Cyprinos carpio*; salmão, *Salmo salar*; truta, *Oncorhynchus mykiss*), do camarão marinho (camarão cinza *Litopennaeus vannamei*) e do camarão de água doce (gigante da malásia, *Macrobrachium rosenbergi*).

A aquicultura continua a ser o setor de produção animal que mais cresce: aumentou o consumo médio *per capita* mundial, proveniente dela, de 0,8 Kg em 1970 para 7,8 Kg em 2008 e cresce em média anualmente 6,6% (FAO, 2010).

No Brasil, a aquicultura cresceu a princípio com o cultivo de carpas, trutas e camarão cinza. No início do século XXI, a carcinicultura brasileira estava na primeira posição no quesito produtividade. Mas a densidade em torno de 400 camarões por metro quadrado, não foi tolerada pelas doenças, principalmente o vírus da mancha

branca, causando queda significativa na produção. Fatores como antidumping, queda do dólar e o baixo valor no mercado internacional também contribuíram para a diminuição da produção. Assim, a alternativa para os piscicultores foi a piscicultura.

A tilápia é o peixe mais indicado para cultivo por ser rústico, de fácil reprodução, aceitar ração industrializada, excelente conversão alimentar, não ter espinha em “Y” e características organolépticas ideais. Desta forma, a tilapicultura se estabeleceu, tornando a tilápia o peixe mais produzido no Brasil. Inicialmente cultivada de forma extensiva em viveiros escavados, atualmente seu cultivo é mais rentável de forma superintensiva em tanques-redes dentro de açudes e lagos. Neste sistema, o animal depende totalmente do alimento fornecido, cujo hoje em dia está um alimento mais ajustado às necessidades dos peixes com hábito alimentar onívoro.

Na tilapicultura intensiva o bem estar animal é praticamente impossível. Fatores como densidade de estocagem, temperatura, nutrição, alimentação, manejo aplicado e a falta de cuidados sanitários podem causar estresse que tem como consequência a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças causadas, principalmente, por parasitas, bactérias e fungos.

A alta densidade populacional de peixes ou outras condições que produzem aumento no teor de amônia favorecem o incremento da população bacteriana por todo o cultivo. A maior parte das doenças bacteriana pode ser controlada com a adição de produtos na água ou na ração (CYRINO *et al.*, 2004)

As bactérias são encontradas naturalmente no intestino de tilápia, e pode se tornar infecciosa quando o ambiente ou condições de cultivo são favoráveis a sua proliferação.

A profilaxia e o tratamento de doenças em peixes são feitos com a utilização de sal, permanganato de potássio, triclorfone, introdução de vitaminas na ração e antibióticos. O uso indiscriminado deste último pode, ao longo do tempo, gerar bactérias cada vez mais resistentes. Além de aumentar o tempo de carência para o consumo da carne para até 40 e a não observância desse período pode trazer graves consequências para o consumidor.

Uma alternativa, bastante pesquisada, para diminuir o uso de antibiótico, é o uso de probióticos ou bactérias benéficas, as quais controlam patógenos através de uma variedade de mecanismos (BALCÁZAR *et al.*, 2006). Probióticos geralmente

são definidos como microrganismos que, quando ingeridos na quantidade ideal, propiciam saúde ao hospedeiro. Muitos probióticos sugeridos como agentes de controle biológico na aquicultura pertencem às bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus* and *Carnobacterium*), aos gêneros: *Vibrio* (*V. alginolyticus*), *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* (BALCÁZAR *et al.*, 2006); e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LARA-FLORES *et al.*, 2003). Muitas pesquisas com a esta última tem sido publicadas como promotor de crescimento (LARA-FLORES *et al.*, 2003; CHIU *et al.*, 2010) e como imunoestimulantes (REQUE *et al.*, 2010; EL-BOSHY *et al.*, 2010; CHIU *et al.*, 2010; ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2008).

O gênero *Aeromonas* são um dos principais agentes com potencial patogênico e tem sido responsável por perdas econômicas consideráveis na aquicultura (SILVA, 2010). Peixes com sintomas deste patógeno podem apresentar exoftalmia, abdômen distendido contendo líquido opaco e/ou ligeiramente sanguinolento, petéquias nas vísceras e na parede interna da cavidade abdominal, hiperplasia do fígado, baço e rins (KUBTIZA E KUBTIZA, 2004).

Observando o potencial imunoestimulante da levedura *S. cerevisiae* e a capacidade patogênica da bactéria *Aeromonas hydrophila*, objetiva-se com esta pesquisa a suplementação de ração para alevinos de tilápia, *O. niloticus*, com a levedura e posterior observação da resistência do peixe ao desafio de inoculação da bactéria.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Tilápia Nilótica

O nome “tilápia” deriva da palavra usada por colonos africanos que significa “peixe” (TREWAVAS, 1982). Pertencente à família Cichlidae, esta, agrupa os peixes conhecidos com popularmente como tilápias.

Smith (1840) *apud* El-sayed (2006), foi o primeiro a descrever o gênero *Tilapia*. Depois este gênero foi dividido em dois subgêneros, baseando-se no comportamento reprodutivo e no hábito alimentar: *Tilapia* (desova no substrato) e *Sarotherodon* (incuba ovos e larvas na boca, machos e fêmeas). Em seguida o subgênero *Sarotherodon* foi elevado para gênero e subdividido em mais dois gêneros, *Oreochromis* e *Sarotherodon*, baseando-se em que fêmeas (*Oreochromis*), machos (*Sarotherodon*) ou ambos os sexos (*Sarotherodon*) apresentavam comportamento de incubação de ovos na boca (EL-SAYED, 2006). No início dos anos 80, havia duas classificações de tilápia, propostas por Trewavas *apud* Fishelson e Yaron (1983):

(1) Inclui cinco gêneros: *Tilapia*, *Sarotherodon*, *Oreochromis*, *Tristromella* e *Danakilia*.

(2) Inclui apenas um gênero, *Tilapia*, que se divide em sete subgêneros: *Heterotilapia*, *Pelmatilapia*, *Sarotherodon*, *Nysalapia*, *Alcolapia* e *Neotilapia*.

Atualmente, a classificação mais usada é mais simples, divide em três gêneros de acordo com o comportamento reprodutivo. Se a incubação dos ovos é realizada em ninhos o gênero é *Tilapia*, se a incubação ocorre dentro da boca da fêmea o gênero é *Oreochromis* e se a incubação dos ovos for realizada tanto pelo macho como pela fêmea o gênero é *Sarotherodon* (HILSDORF, 1995).

O gênero *Oreochromis* é o de maior importância econômica na aquicultura (POPMA & LOVSHIN, 1994), como maior destaque para tilápia áurea (*O. aureus*), tilápia mossambica (*O. mossambicus*), tilápia de Zanzibar (*O. hornorum*) e tilápia vermelha (híbrido de *Oreochromis* spp).

A maturação sexual pode ser alcançada entre 5 e 6 meses de idade, com peso em torno de 150 g, dependendo das condições ambientais. No entanto, é possível que ocorra desova em peixes de 20 g (POPMA & LOVSHIN, 1994).

Seu cultivo iniciou no Quênia em 1924 e, em seguida no Congo em 1937 (LANDAU, 1992). Nos anos 70, a tilápia foi amplamente disseminada no Brasil como peixe promissor para a aquicultura.

As tilápias são naturais do continente Africano e sua produção concentra-se em países de climas tropical e subtropical. A produção em todo o mundo vem crescendo principalmente devido às exportações para os Estados Unidos e comunidade européia. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é o peixe mais criado no Brasil, com produção de 69.078 toneladas em 2004, o sétimo maior produtor mundial depois da China, Egito, Filipinas, Indonésia, Tailândia e Taiwan (FAO, 2006), tornando-se cada vez mais importante na economia nacional.

A tilápia do Nilo é o segundo peixe de água doce mais cultivado em todo o mundo, ficando atrás apenas da carpa comum (BORGUETTI et al. 2003). A produção mundial anual de tilápias ultrapassa as 1.385.000 t e sua criação está em contínua expansão segundo o mesmo autor. A espécie destaca-se por sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI et al., 1999). Pode ser cultivado tanto em água doce, quanto estuarina ou salobra (MEURER et al. 2003). Outros fatores favoráveis ao seu cultivo são o baixo custo, principalmente em relação à produção de alevinos e alimentação, bem como a qualidade da sua carne (LAHAV & RA'NAM, 1997).

De hábito alimentar onívoro, a tilápia nilótica aceita ração comercial desde o período pós-larval (MEURER et al., 2002). Sendo de baixo nível trófico, apresenta vantagens em relação às espécies carnívoras que utilizam grande quantidade de farinha de peixe nas rações (FITZSIMMONS, 2000). Ainda aproveitam bem o amido como fonte de energia.

O mercado consumidor aceita muito bem o produto principal da tilapicultura, o filé de tilápia, o qual possui excelente qualidade organoléptica e nutritiva, destacando a carne branca e a textura firme. E a ausência de espinhos em “Y” facilita a sua filetagem e proporciona filés sem espinhos (HILDSORF, 1995).

2.2 Probióticos na Aquicultura

O termo probiótico vem do grego 'pro bios' que significa 'para vida'. A história dos probióticos começou com a história do homem; queijo e leite fermentados eram bem conhecidos pelos gregos e romanos que recomendavam seu consumo, especialmente para crianças e convalescentes (GISMONDO *et al.*, 1999).

Existem muitas definições para probióticos e diferem de acordo com a sua utilização: substância produzido por um organismo, que estimula o crescimento de um outro (LILLEY e STILLWELL, 1965); micróbio vivo, usado como suplemento alimentar, que beneficia o hospedeiro pelo melhoramento do funcionamento intestinal (FULLER, 1989); células de micróbios vivas, administradas como suplemento alimentar, com o objetivo de melhorar a saúde (TANNOCK, 1997); bactéria que promove a saúde de outros organismos (BALCÁZAR *et al.*, 2006); micróbios que são antagonistas a patógenos, mas não são encontrados no ser presente, mesmo que transitório ou residencialmente, no trato gastro intestinal, denominados como agentes de controle biológico (MAEDA, *et al.*, 1997; MORIARTY, 1998); probióticos vivos, mortos ou componentes celulares de microrganismos, que quando administrados na alimentação ou na água de cultivo, beneficiam o hospedeiro por prover resistência a doenças, saúde, maior crescimento, conversão alimentar, resposta ao estresse ou vigor geral, o qual é alcançado ao menos em parte através do equilíbrio microbiano no hospedeiro ou no ambiente de cultivo (MERRIFIELD *et al.*, 2010).

A definição atual e internacionalmente aceita para probióticos é que eles são microrganismos vivos e, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Os probióticos estão emergindo como importante ingrediente alimentar no campo da nutrição (SANDERS, 2003).

A manipulação da microbiota intestinal através da suplementação alimentar com microrganismos é uma abordagem nova não apenas do ponto de vista original, mas também como uma alternativa de modalidade terapêutica viável para superar os efeitos adversos de antibióticos e remédios (NAYAK, 2010).

O aprimoramento da resistência à colonização e/ou efeitos inibitórios diretos contra patógenos são importantes fatores em que probióticos tem reduzido à incidência e a duração de doenças. Cepas de probióticos têm demonstrado inibir

bactérias patogênicas *in vitro* e *in vivo* através de vários mecanismos, além de outros efeitos benéficos, como: exclusão por competição, contribuição a digestão como fonte de nutrientes e enzimas, influência na qualidade da água, aprimoramento da resposta imunológica e efeito antiviral (BALCÁZAR *et al.*, 2006).

O mesmo autor afirma que nos recentes anos, a bases na qual a utilização de aditivos alimentares tem sido modificada na União Européia. Em relação aos aditivos usados na produção de alimentos, esforços têm sido direcionados com respeito a prover a garantia de um alto nível de proteção da saúde humana, bem-estar e saúde animal, uso ambiental e interesse dos consumidores.

Muitas revisões sobre o uso de probióticos na aquicultura mostram que há um potencial, ainda inexplorado. O efeito benéfico de suplementos alimentares como probióticos, prebióticos e simbióticos tem sido registrado uma ampla gama de tipos de animais incluindo peixes (NAYAK, 2010). Pesquisas recentes proveram uma base, mas as aplicações destes estudos são impraticáveis em níveis industriais de cultivo (MERRIFIELD *et al.*, 2010). Claramente, algumas culturas são benéficas ao hospedeiro em termos em relação a promotor de crescimento e redução de incidência de doenças, além de outro efeito indireto que é a redução do uso de compostos farmacêuticos (IRANTO e AUSTIN, 2002).

O futuro do uso de probióticos na aquicultura parece brilhar. Existe uma demanda cada vez maior de produtos para aquicultura e um similar aumento na busca para alternativas para antibióticos (KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008)

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* é um fungo que produz ascos sem a produção de arcosporos e o crescimento da colônia se dá por brotação das células, não produzindo micélio (AGRIOS, 1997). Habita a superfície das frutas, apresenta tamanho médio de 5 µm, sua parede celular apresenta espessura entre 70 – 200 nm, que é principalmente constituída de manoproteínas (FIALHO, 2004).

Este fungo é utilizado pelo homem para produção de bebidas alcoólicas, etanol e panificação. Normalmente nestes processos a função da levedura é apenas como um agente biológico de transformação para no final ser descartada como subproduto (FIALHO, 2004).

Os compostos purificados da parede desta levedura são conhecidos como promotores inatos de mecanismo de defesa e/ou resistência a doenças em vertebrados (CABIB *et al.*, 1982).

A combinação de todos os componentes da parede celular com seu material genético produz um estado fisiológico ótimo em peixes, devido a múltiplas interações, particularmente em consideração ao sistema imune (CERRA *et al.*, 1991).

Muitos experimentos têm mostrado a levedura *S. cerevisiae* como promotor de crescimento e imunoestimulante em peixes: a alimentação com *S. cerevisiae* em tilápia proporcionou melhor eficiência alimentar, sugerindo esta levedura como um apropriado promotor de crescimento (LARA-FLORES *et al.*, 2003); em teste de desafio *in situ* com *A. hydrophila* a levedura é um método alternativo para antibióticos na prevenção de doenças em tilápia (ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2008); a adição desta levedura na alimentação do híbrido de tilápia (*Oreochromis niloticus* - fêmea x *Oreochromis aureus* - macho) mostraram efeitos na performance de crescimento, além de ser potencialmente benéfica no intestino e na imunidade não-específica (HE *et al.*, 2009); a utilização de levedura e parede celular da mesma aumentou a resposta inflamatória não específica causada por *A. hydrophila* em tilápia, sugerindo que teve um efeito benéfico no sistema de defesa imunológico (REQUE *et al.*, 2010); *S. cerevisiae* pode ser utilizado como imunoestimulante no cultivo de tilápia (EL-BOSHY ET AL., 2010); em garoupas, *Epinephelus coioides*, a administração de *S. cerevisiae* promove melhor crescimento, imunidade e resistência contra *Streptococcus* sp. e irridovirus.

O uso de imunoestimulantes na piscicultura é um meio efetivo para aumentar a imunocompetência e a resistência às doenças no peixes. Porém, pouco se sabe quanto a sua eficácia, limitações de uso e as respostas a longo prazo. Estudos mais detalhados são necessários para verificar-se quanto, como, para que e qual imunoestimulante deve ser utilizado (REQUE, 2005).

2.4 *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas, deriva do grego “aer” que significa ar ou gás e “monas” que significa unidade, portanto unidades produtoras de gás (MARTIN-CANAHAAN e JOSEPH, 2005).

A bactéria *A. hydrophila* é um bastonete e possui flagelos polares. Não produz esporos, é gram negativa e não capsulada, aeróbia e anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993), normalmente oxidase e catalase positiva, capazes de degradar nitritos e nitratos, fermentam a D-glucose como fonte principal de carbono e energia (RIBEIRO, 2008). Seu tamanho varia de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro e 1,0 a 3,5 µm de longitude (EPA, 2006).

O gênero *Aeromonas* ocorre em ambientes aquáticos, como: água doce, água potável, águas contaminadas, água do mar, sistemas de distribuição para consumo, águas termais, lagos, rio, mar, esgotos e solos (LIBISCH *et al.*, 2008; SEPE *et al.*, 2008).

Linhagens de *A. hydrophila* produzem gelatinase, caseinase, elastase, lipase, lecitinase e deoxiribonuclease, juntamente com hemolisinas, citotoxinas e enterotoxinas (NORD *et al.*, 1975).

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água (POST, 1987), que tem como características: anorexia, dilatamento da região abdominal, úlceras e hemorragia de órgãos internos, aumento do volume dos rins e do baço, enterorragia e hemoperitônio (MORAES E MARTINS, 2004).

Esta espécie é mais aparece com mais frequência do que outras espécies do gênero, sendo que esta também reúne os isolados de maior virulência (PAVANELLI *et al.*, 2008) e são as principais causadoras perdas significativas na piscicultura brasileira (COSTA, 2003).

Sua virulência está fortemente relacionada com virulência uma camada-S na superfície das células (THUNE *et al.*, 1986), cuja é uma estrutura composta por proteínas ou glicoproteínas ligadas à parede celular bacteriana cujas funções são de servir como reservatório de água e nutrientes, aumentar a aderência à superfícies através da formação de biofilme e do poder infectante, aumentar a capacidade invasiva das bactérias patogênicas que escapam mais facilmente à ação dos fagócitos e aumentar a resistência microbiana a biocidas (CARVALHAL & ALTERTHUM, 1999).

O controle das infecções causadas por *A. hydrophila* está ligado ao controle de fatores que facilitam a invasão do hospedeiro. Quando há um surto de doença, especialmente em sistemas de produção de peixes, geralmente não é possível determinar o principal fator estressante ou as fontes de infecções primárias, nem é

possível modificar o fluxo de água ou a densidade de estoque. Assim, em geral, o tratamento aplicado envolve o uso de antibióticos orais (COSTA, 2003): cloranfenicol, florfenicol, tetraciclina, sulfonamida, derivados nitrofuranos e ácidos piridonecarboxílicos (AOKI e EGUSA, 1971; ENDO *et al.*, 1973; KATAE *et al.*, 1979; FUKUI *et al.*, 1987).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar concentrações de levedura (*S. cerevisiae*) em ração para alevinos de tilápia nilótica (*O. niloticus*), sob parâmetros de crescimento e, sua resistência a bactéria (*A. hydrophila*).

3.2 Objetivos Específicos

- Observar a colonização pela levedura no intestino e na unidade experimental;
- Observar a colonização de bactéria *A. hydrophila* na unidade experimental
- Avaliar a resistência à inoculação da bactéria;
- Observar a levedura na ração como promotor de crescimento:
 - Desempenho zootécnico;
 - Rendimento de carcaça;
 - Sobrevivência;
 - Conversão alimentar;
 - Utilização de proteína;
 - Utilização de energia.

4. MATERIAI E MÉTODOS

4.1 Local

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal no *Campus* Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale São Francisco. O Laboratório dispõe de 20 aquários de 60 litros, postos em duas bancadas de mármore paralelas, com aeração individual, uma caixa de água de 1000 L como reservatório de água, baldes, balança, mangueiras e peneiras, os quais serão necessários para o manejo durante o experimento.

4.2 Procedência de *S. cerevisiae* e *A. hydrophila*

A levedura utilizada na ração foi obtida de remédio usado para recomposição da microbiota gastro-intestinal humana, numa concentração de 10^8 UFC/ml. Foi realizada uma conferência da concentração informada pelo fabricante em meio BDA.

A bactéria utilizada foram oriundos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF. Esses isolados foram obtidos a partir do rim, tegumento e lesões de pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*). Estes animais foram provenientes da Barragem de Sobradinho-BA e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura (CIRPA) de Bebedouro, da 3° SR CODEVASF, Petrolina-PE. Os isolados de *A. hydrophila* foram previamente identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quin et al. (1994) e através da PCR para confirmação de gênero e espécie, segundo metodologia descrita por Ghatak et al. (2007). As culturas foram repicadas em meio Agar Triptona de Soja (TSA), e então utilizadas para caracterização molecular.

4.3 Animais Experimentais

Foram selecionados 120 alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, variedade Chitralada, com a mesma idade, de forma que, as unidades experimentais tenham biomassa inicial estatisticamente iguais. Estes animais foram provenientes do CIRPA de Bebedouro, da 3° SR CODEVASF, Petrolina-PE.

4.4 Unidade Experimental

Uma unidade experimental foi composta por um aquário transparente (50x30x40 cm) contendo 60 L de água, seis alevinos de tilápia e aeração constante através de uma bomba de 3,5 W com duas saídas de 3 L/min cada, sendo uma saída por aquário.

4.5 Confeção das Rações

A partir de uma ração comercial com 55% PB (proteína bruta) e 3.000 Kcal de energia, foram adicionados os seguintes níveis de *Saccharomyces cerevisiae*: 0 (controle), 10^3 , 10^5 e 10^7 UFC. A levedura foi diluída em água destilada e misturada com a ração. Esta foi peletizada em moedor de carne industrial e em seguida secada em estufa com ventilação forçada a 40 °C por 24h. Após a secagem, a ração foi quebrada em granulometria adequada à ingestão pelos alevinos.

A Bromatologia da ração, o enriquecimento mineral e vitamínico estão apresentados respectivamente na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 1. Bromatologia da ração informada pelo fabricante (Purina).

Parâmetros Bomatológicos	Concentração
Umidade (max.)	13,00%
Matéria Fibrosa (max.)	5,00%
Proteína Bruta (min.)	55,00%
Extrato Etéreo (min.)	10,00%
Cálcio (max.)	2,00%
Fósforo (min.)	0,60%
Cinzas	14,00%

Tabela 2. Enriquecimento mineral da ração informada pelo fabricante (Purina).

Enriquecimento Mineral	mg/Kg de ração
Magnésio	0,4
Manganês	10
Cobre	10
Ferro	75
Zinco	100
Iodo	1
Selênio	0,15

Tabela 3. Enriquecimento vitamínico da ração informada pelo fabricante (Purina).

Enriquecimento Vitamínico	Concentração
Vitamina A (UI/Kg)	18.000
Vitamina D3 (UI/Kg)	3.600
Vitamina E (UI/Kg)	270
Vitamina K (mg/Kg)	36
Ácido Fólico (mg/Kg)	15
Colina (mg/Kg)	720
Biotina (mg/Kg)	0,45
Niacina (mg/Kg)	252
Pantotenato de Cálcio (mg/Kg)	72
Tiamina (mg/Kg)	29
Riboflavina (mg/Kg)	36
Piridoxina (mg/Kg)	36
Vitamina B12 (mg/Kg)	36
Vitamina C (mg/Kg)	500

4.6 Tratamentos

O presente experimento foi composto de 5 tratamentos e 4 repetições, em um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram os seguintes:

- 0Sc/SS: 0 UFC/Kg de *S. cerevisiae* na ração (controle) e injeção de solução salina;
- 0Sc/Ah: 0 UFC/Kg de *S. cerevisiae* na ração (controle) e inoculação de 10^8 UFC/ml de AH;
- 10^3 Sc/Ah: 10^3 UFC/ml de *S. cerevisiae* na ração e inoculação de 10^8 UFC/ml de AH;
- 10^5 Sc/Ah 10^5 UFC/ml de *S. cerevisiae* na ração e inoculação de 10^8 UFC/ml de AH;
- 10^7 Sc/Ah: 10^7 UFC/ml de *S. cerevisiae* na ração e inoculação de 10^8 UFC/ml de AH; 0Sc/SS, 0Sc/Ah, 10^3 Sc/Ah, 10^5 Sc/Ah, 10^7 Sc/Ah

O tratamento nutricional teve duração de 30 dias. Na sequência, os animais foram mantidos por 48 horas para recuperação do estresse da biometria final, sendo que neste tempo foram fornecidas as mesmas rações do período nutricional. Assim no 33º dia de experimento foram feitas as inoculações para posteriores avaliações.

4.7 Layout

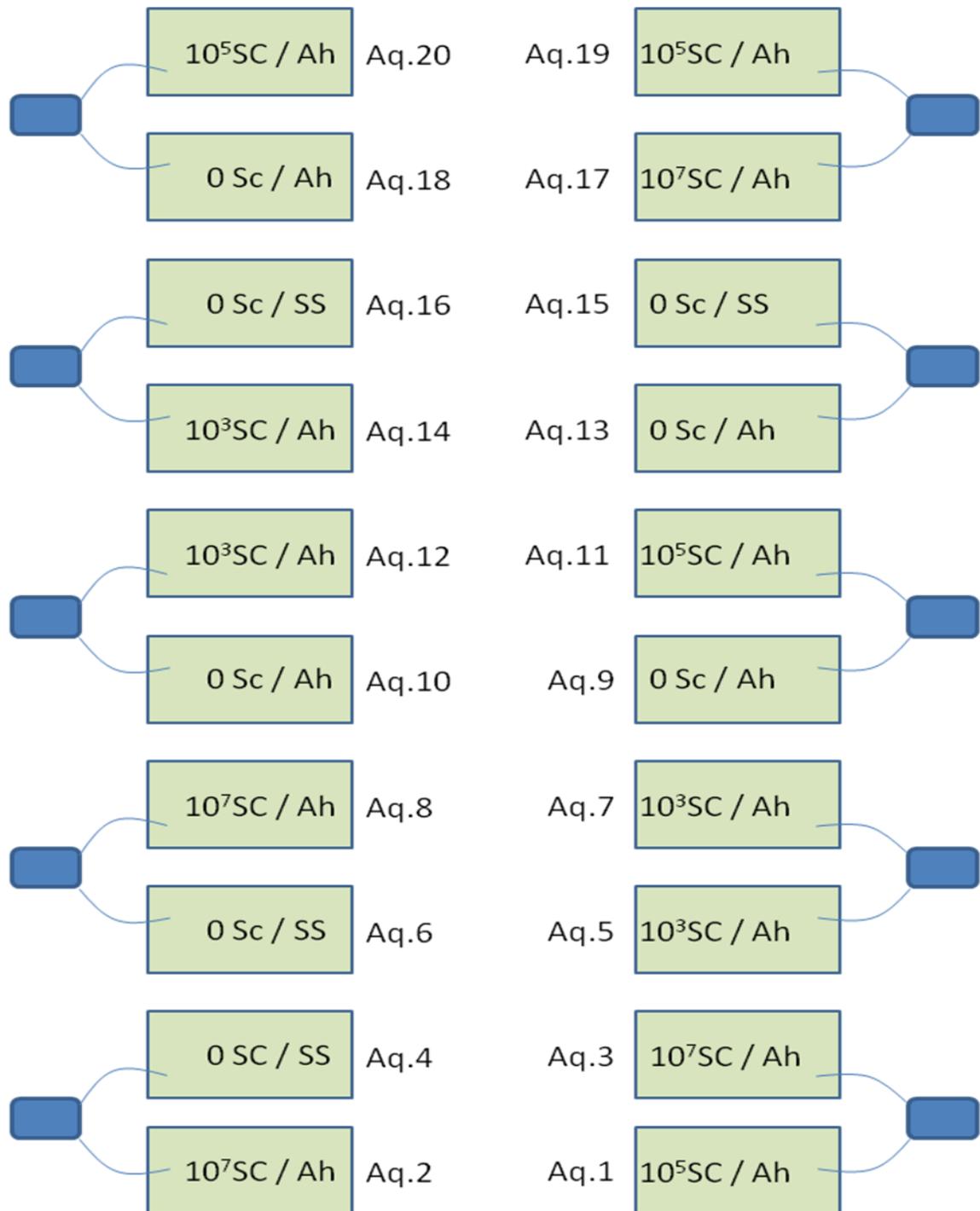


Figura 1. Esquema da disposição dos aquários e bombas de aeração, mostrando o experimento em delineamento inteiramente casualizado.

4.8 Manejo

Diariamente os aquários foram sifonados duas vezes (8:00 e 15:00 horas) para retirada de fezes, eventuais sobras de ração com renovação de 50% da água, resultando em uma renovação diária de 100%.

A temperatura da água foi aferida diariamente, os demais parâmetros como: pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água serão coletados a cada 4 dias. Todos os parâmetros de qualidade de água eram coletados de manhã, antes da primeira sifonagem, e de tarde, antes da última sifonagem.

As rações eram fornecidas, num percentual de 10% da biomassa total de cada aquário, três vezes por dia: 8:30 (30%), 12:00 (30%) e 16:00 (40%).

A cada dez dias, foi realizada um pesagem de todos os peixes para correção da quantidade de ração fornecida. No dia antes da biometria, os peixes foram alimentados com a quantidade diária de ração dividida em duas vezes iguais: 8:30 e 12:00, afim de esvaziar o máximo possível os tratos digestivos.

A biometria final será realizada no 30º dia de cultivo em que foram coletados os dados de desempenho zootécnico, colonização da levedura e bactéria e hematologia.

4.9 Desempenho Zootécnico

A performance de crescimento foi determinada pelas seguintes fórmulas:

- $GP = PF \text{ (g)} - PI \text{ (g)}$; em que GP, PF e PI são o Ganho de Peso, Peso Final e Peso Inicial, respectivamente;

- $TCE = 100 \times (\ln PF - \ln PI) / T \text{ (dias)}$; em que TCE e T são a Taxa de Crescimento Específico e Tempo, respectivamente;

- $CAA = RF \text{ (g)} / GP$; em que CAA e RF são a Conversão Alimentar Aparente e Ração Fornecida, respectivamente;

- $SOB = (N^{\circ}PxF / N^{\circ}Pxl) \times 100$; em que SOB, $N^{\circ}PxF$ e $N^{\circ}Pxl$ são, Sobrevivência, Número de Peixes Final e Número de Peixes Inicial, respectivamente.

4.10 Coleta de Sangue

De cada aquário foi retirado aleatoriamente um peixe para coleta de 1,5 ml sangue através de punção caudal com seringa banhada com solução de Fluoreto e EDTA. Este sangue coletado foi destinado à determinação de glicose e hemograma (Figura 2).

4.11 Análise da Microbiota Intestinal

Um peixes dos tratamentos 0Sc/SS, 0Sc/Ah, 10^3 Sc/Ah, 10^5 Sc/Ah, 10^7 Sc/Ah, foi aleatoriamente escolhido para retirada do intestino e avaliar a colonização da levedura. Assim, do mesmo peixe que foi realizado a coleta de sangue, o mesmo foi sacrificado por secção medular, para coleta do intestino (Figura 3). Este órgão foi homogeneizado por processo de maceração (Figura 4) e em sequência feito uma alçada e semeada em meio BDA para identificação da levedura.

4.12 Análise microbiológica da água

Ao final do experimento foi feita uma alçada de todas as unidades experimentais e semeada em meio de cultura BDA, para identificação de *S. cerevisiae*, e TSA, para identificação de *A. hydrophila*.

4.13 Desafio Sanitário com *Aeromonas hydrophila*

A injeção de solução salina e a inóculo da bactéria *A. hydrophila* (Figura 5) foi realizada nos peixes através de uma seringa de 3 mL, via intramuscular, latero-dorsal esquerdo em cada peixe. O inóculo bacteriano diluído em solução salina estéril (Figura 6), na concentração específica de cada tratamento de acordo com a escala de turvação de Mc Farland (Figura 7), sendo aplicado em volume de 1,0 mL/animal (Figura 8).

4.14 Identificação Bacteriana

Para análise bacteriana, foi realizada a identificação da bactéria através de coloração de gram, oxidase e catalase. Posteriormente será realizado PCR.

4.15 Análise de Células Vermelhas do sangue

O soro foi obtido por centrifugação do sangue sem anticoagulante a 5.000 rpm por 10 minutos, no laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

As amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de polipropileno (tipo *Eppendorf*) com capacidade para 1,5 mL, parte das amostras com EDTA foram processadas em até 4 horas para a realização de hemogramas.

4.15.1 Hematimetria

Para realização do hemograma, na hematimetria, colocou-se no tubo de ensaio 4 mL de líquido de Gauer e posteriormente 20 μ L da amostra de sangue, misturando-os delicadamente. Após isto, 20 μ L do sangue diluído foram transferidos para a Câmara de Neubauer, preenchendo a área central dessa câmara, onde foi realizada a contagem de eritrócitos em 5 quadrantes centrais, através de microscopia óptica sob objetiva de 40x. O número total de eritrócitos contados nos 5 quadrantes centrais foi multiplicado por 10.000 (fator de correção), obtendo-se assim a hematimetria por microlitro de sangue (BATISTA, 2011).

4.15.2 Leucometria Total

Para quantificar os leucócitos totais, dilui-se 20 μ L de sangue em tubo de ensaio contendo 400 μ L de Líquido de Turk e, passados 5 minutos, uma amostra do sangue diluído foi adicionada à Câmara de Neubauer, onde realizou-se a contagem dos leucócitos nos 4 quadrados externos, sob microscopia óptica em aumento de 40X. O somatório dos leucócitos contados nos 4 quadrados foi multiplicado pelo fator de correção, obtendo-se assim a leucometria total por μ L de sangue,

obedecendo a seguinte fórmula: $LG:1+2+3+4 \times 50/\text{mm}^3$, sendo: 1,2,3,4 quadrados externos; e 50 valor da correção (BATISTA, 2011).

4.15.3 Volume Globular (VG)

O volume globular foi determinado manualmente pela técnica do microhematócrito, onde preencheu-se por capilaridade 2/3 de um tubo capilar de vidro para microhematócrito (7cm x 1mm) com o sangue total. Este tubo capilar imediatamente foi limpo e teve uma de suas extremidades fechadas com massa selante, sendo imediatamente transferido, com a extremidade ocluída voltada para o lado externo, para uma centrífuga de microhematócrito por 10 minutos, a 10000rpm. Para a leitura do volume globular (%), o capilar foi alinhado sobre o cartão de leitura, com a extremidade do plasma na linha 100, deslocou-se o cartão até a base das hemácias assentadas posicionadas na linha 0. A leitura do valor do hematócrito foi o valor da linha limite entre as hemácias e os leucócitos (BATISTA, 2011).

4.15.4 Volume Corpuscular Médio

VCM (Volume Corpuscular Médio): valor hematimétrico que corresponde ao volume corpuscular médio, ou seja, é o volume dos eritrócitos medido em fentolitros (fL). É um resultado da divisão do hematócrito pela hematimetria em milhões x 10:

$$\text{VCM} = \frac{\text{hematócrito (\%)}}{\text{Hematimetria (em milhões)}} \times 10$$

4.15.5 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

É um valor hematimétrico que corresponde a hemoglobina corpuscular média, sendo então, o total de hemoglobina por eritrócito (peso de hemoglobina nos eritrócitos) em média. Sua unidade é o picograma ($\text{g} \times 10^{-12}$) e seu resultado é proveniente da divisão da hemoglobina (em g/dL) pela hematimetria (em milhões) x 10.

$$\text{HCM} = \frac{\text{hemoglobina (g/dL)}}{\text{Hematimetria (em milhões)}} \times 10$$

4.16 Qualidade da água

Durante o experimento os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido, matutina e vespertina foram, respectivamente: $27,56 \pm 0,05$ °C e $28,32 \pm 0,10$ °C; $7,31 \pm 0,03$ e $7,16 \pm 0,05$; $5,46 \pm 0,08$ e $5,38 \pm 0,11$ mg/L.

4.17 Análise Estatística

Após a avaliação de todos os parâmetros propostos de desempenho, parâmetros hematológicos e colonização de micro organismos, foi feita a análise de variância e teste de Tukey através do software *Assistat 7.6 beta*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise microbiológica

Ao final do experimento foi observado através de análise bioquímica que, diferente dos tratamentos controles, os tratamentos com alimentação suplementada com *S. cerevisiae* houve colonização desta levedura tanto na água do aquário como no intestino. Concordando com Meurer (2005), que encontrou colonização de *S. cerevisiae* no intestino de tilápia alimentadas com ração suplementadas com esta levedura. O autor ainda observou menor concentração de coliformes totais na água experimental dos tratamentos suplementados, o que mostra algum mecanismo de controle da levedura sobre os coliformes.

Da mesma forma foi confirmada a mortalidade dos peixes pela ação da bactéria inoculada, através de alçada do rim semeada em meio TSB.

5.2 Desempenho zootécnico

Os valores médios dos parâmetros relativos ao desempenho zootécnico e glicose dos alevinos de tilápia, após tratamento de 30 dias com ração de 55% PB com níveis crescentes de *S. cerevisiae* na ração, apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 4. Valores médios de desempenho zootécnico de alevinos de tilápia alimentados com as diferentes concentrações de *S. cerevisiae* na ração.

Variáveis	Tratamentos					CV (%)
	0 Sc/SS	0 Sc/Ah	10 ³ Sc/Ah	10 ⁵ Sc/Ah	10 ⁷ Sc/Ah	
PMI	12,80	12,82	12,80	12,87	12,85	1,02
PMF	36,02	41,19	41,39	38,96	42,63	7,89
GP	23,21	28,37	28,29	26,09	29,78	11,58
SOB. (%)	87,50	100,00	95,83	91,67	79,17	22,84
TCE	3,32	3,75	3,78	3,56	3,87	7,12
CAA	2,01	1,63	1,72	1,97	1,47	18,14

As variáveis de GP, SOB, TCE, CAA não foram influenciadas pelos tratamentos com diferentes níveis de concentração de *S. cerevisiae* na ração. Em relação à sobrevivência, houve uma mortalidade pontual referente à disputa por espaço e alimento, o que é normal em espécies da família *Cichlidae*.

Segundo He *et al.* (2009) em tilápia híbridas (*O. niloticus* X *O. aureus*), num experimento usando crescentes concentrações de *S. cerevisiae* não houve diferença significativa para GP, TCE, SOB e CAA.

Em contraste, Lara-Flores *et al.*, 2003, testando níveis de inclusão de probióticos (*S. cerevisiae* e mistura de *Streptococcus faecium* com *Lactobacillus acidophilus*) em dietas para tilápia (*O. niloticus*), observou-se melhor crescimento no tratamento com a levedura; com garoupa (*Epinephelus coioides*) Chiu *et al.* (2010), observou diferença significativa para GP e CAA nos animais alimentados com *S. cerevisiae* em relação ao grupo controle; Resultados obtidos por Vázquez-Juárez *et al.* (1993), em que isolados de leveduras intestinais de truta arco-íris foram introduzidas no trato digestivo de peixes da mesma espécie e produziram aumento significativo no crescimento. Meurer (2005), não encontrou diferença significativa com a suplementação da levedura para tilápia do Nilo para desempenho produtivo e sobrevivência.

As razões para diferentes resultados para o uso de *S. cerevisiae* como promotor de crescimento para tilápia e até outras espécies de peixes, podem ser

devido as diferentes condições experimentais e ao tipo de balanceamento da ração base usada.

5.3 Hematologia

Os valores médios dos parâmetros hematológicos e glicose dos alevinos de tilápia, após tratamento de 30 dias com ração de 55% PB com níveis crescentes de *S. cerevisiae* na ração, apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 5. Valores médios de parâmetros hematológicos de alevinos de tilápia alimentados com as diferentes concentrações de *S. cerevisiae* na ração.

Variáveis	Tratamentos					CV (%)
	0 Sc/SS	0 Sc/Ah	10 ³ Sc/Ah	10 ⁵ Sc/Ah	10 ⁷ Sc/Ah	
Hematócrito (%)	28,75	29,50	32,00	34,25	29,75	16,51
Eritrócitos (x10 ⁶ / µl)	4,89	4,85	4,64	4,88	4,29	10,85
Hemoglobina (g/dL)	9,58	10,66	10,67	11,41	9,89	15,94
VCM (fl)	59,17	66,47	68,27	71,32	70,06	23,32
HCM (%)	0,20	0,22	0,23	0,24	0,23	22,63
Leucócitos (cel/µl)	25937,50	25590,00	25300,00	25675,00	25587,50	8,45
Glicose (mg/dL)	55,75	59,25	55,00	48,50	49,00	7,12

As variáveis hematócrito, eritrócito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e glicose não tiveram diferença estatística, portanto, não foram influenciadas pelos tratamentos com diferentes níveis de concentração de *S. cerevisiae* na ração.

Os parâmetros sanguíneos de hemoglobina estão ligeiramente maiores e o hematócrito estão de acordo com Tavares-dias e Moraes (2003) em estudo hematológico da *Tilapia rendalli*.

Reque *et al.*, (2005) não encontrou diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros sanguíneos eritrócito e hematócrito, porém observou menos número de leucócitos nos tratamentos sem alimentação suplementada por probiótico. Este último parâmetro contraria também El-Boshy *et al.*, (2010), que não encontrou diferença significativa na contagem de leucócitos entre os tratamentos.

5.4 Mortalidade

O tratamento controle, que não recebeu inoculação de *A. hydrophila* sobreviveram. Todos os peixes quem receberam inoculo bacteriano morreram em menos de 12 horas. Mostrando, portanto, que a alimentação suplementada com *S. cerevisiae* não surtiu efeito na imunologia de tilápia para combate da bactéria *A. hydrophila*. Após a inoculação os peixes apresentaram apatia e redução dos movimentos respiratórios. Nieto et al. (1991), sugere que estas manifestações são resultados dos produtos extracelulares apresentarem efeito narcótico atuando no sistema nervoso central.

Concordando com este resultado, Boijink et al. (2001), usando concentrações bacteriana de *A. hydrophila* semelhantes, observou 100% de mortalidade em 24 horas depois da inoculação em alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*).

Contrariando, Abdel-Tawwab et al., 2008, mostrou que após inoculação de *a. hydrophila* (10^5 UFC/ml) a mortalidade diminui com o aumento de suplementação de *S. cerevisiae* na ração. El-Boshy et al., conclui que *S. cerevisiae* pode ser utilizada como imunoestimulante para aumento da resistência a infecção pela bactéria *A. hydrophila* (10^7 UFC/ml).

Apesar destes experimentos terem obtido resultados positivos ao uso da levedura como probiótico, foram utilizados peixes com peso médio entre 80 e 150 g, o que é otimizado por já terem mais resistência imunológica além de uma baixa relação peso médio/concentração do inoculo.

Estima-se que a concentração injetada neste experimento, esteja acima da concentração de DL50 da bactéria para os peixes com peso médio em torno de 40 g. O volume do inoculo também foi elevado para ser injetado intramuscularmente, pois foi observado refluxo.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo indica que a levedura não apresentou efeito sobre os parâmetros de crescimento e hematológicos dos peixes suplementados. O probiótico também não foi eficiente em reduzir a mortalidade provocada por *A. hydrophila* inoculada na dose de 10^8 UFC/ml/peixe. Porém necessita-se de mais estudos a fim de encontrar a concentração DL50 de *A. hydrophila* para *O. niloticus*, objetivando assim, reduzir a agressividade da mesma e permitir o acompanhamento da evolução da patogenia bacteriana nos peixes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, T.; EGUSA, S. Drug sensitivity of *Aeromonas liquefaciens* isolated from freshwater fishes. Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries, v.37, p.176-185, 1971.

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A.; ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. v.280, p.185-189, 2008.

AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited, 1987, p.171-173. POST, G. Fish health. T. F. H. Publications, 1987, p.37-41.

BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDREL, D.; MÚZQUIZ, J.L. The role of probiotic in aquaculture. Veterinary Microbiology. v.114, p.173-186, 2006.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Inoculação bacteriana de aeromonas de *Aeromonas hydrophila* e sobrevivência de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). Ciência Rural, v.31, n.3, 2001, p. 503-507.

CABIB, E.; ROBERTS R.; BOWERS B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. Annu Rev. Biochem. 1982;51:163 – 93.

CARVALHAL, M.L.; ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 2, p. 9-23.

CERRA, F.B.; LEHMAN, S.; KONSTANTINIDES, N.; FISH, J.; KOSNTANTINIDES, F.; LICARI, J.J.; HOLMAN, R.T. Improvement in immune function in ICU patients by enteral nutrition supplemented with arginine. RNA and menhaden oil independent of nitrogen balance. Nutrition, v.7, p.193-199. 1991.

Chiu, C. H.; Cheng, C. H.; Gua, W. R.; Guu, Y. K.; Cheng, W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology, v.29, 2010, p. 1053-1059.

COSTA, A.B. Caracterização de do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, SP: USP, 2003. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração de Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, 2003.

CYRINO, J.E.P; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArte, 533p. 2004.

EL-BOSHY, M.E.; EL-ASHRAM, A.M.; ABDELHAMID, F.M.; GADALLA, H.A. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology. v.28, p.802-808, 2010.

EL-SAYED, A.M. Tilapia Culture. Cambridge, MA, p. 277, 2006.

ENDO, T.; OGISHIMA, K.; HAYASAKA, H.; KANEKO, S.; OHSHIMA, S. Application of oxolinic acid as a chemotherapeutic agent against infections diseases in fishes. Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries. V.39, p.165-171, 1973.

EPA, Environmental Protection Agency. 2006. *Aeromonas*: human health criteria document. Washington, 2006.

FAO, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p. 218.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria. 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation.

FIALHO, M.B. Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. Piracicaba, 2004. 60p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FISHELSON, L.; YARON, Z. Proceedings of the International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel, p.XI, 1983.

FUKUI, H.; FUJUHARA, Y.; KANO, T. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. *Fish Pathology*, v.22, p.127-132, 1992.

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

GISMONDO, M.R.; DRAGO L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12 (1999) 287-292.

HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RINGØ, E.; YOON, I. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in cages. *Aquaculture*. v.294 , 2009, p. 99-107.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. B. Inst. Pesca, São Paulo, v.22, 1995, p.73-84.

IRANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. v. 25. p. 633-642, 2002.

KATAE, H.; KUONO, K.; TAKASE, Y.; MIYASAKE, H.; HASHIMOTO, M.; SHIMIZU, M. The evaluations of piromidic acid as antibiotic in fish: as *in vitro* and *in vivo* study. *Journal Infectious Diseases*. v.127, p.284-290, 1973.

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.

KUBTIZA, F.; KUBTIZA, L.M.M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 4 ed. Jundiá, SP, 2004. p. 118.

Lara-Flores M.; Olvera-Novoa, M. A; Guzmán-Méndez, B. E.; López-Madrid, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. v.216, 2003, p. 193-201.

LIBISCH, B., GISKE, G. C., KIROV, S. M., 1993. The public health significance of *Aeromonas* spp. In foods. *Int J Food Microbiol*, 20, 179-198.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. v. 147. p. 747-748, 1965.

MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia*. v. 358. p. 285-290, 1997.

MARTIN-CARNAHAN, A. M., JOSEPH, S. W., 2006. Family I. *Aeromonadaceae* Colwell, Macdonell and De Ley 1986. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology pp. 556-578. Edited by D.R. Boone, R.W. Castenholz & G.M. Garrity. New York: Springer.

MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M.; BØGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGØ, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. v. 302. p. 1-18, 2010.

MEURER, F. Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como probiótico para as fases iniciais do cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Maringá, PR; UEM. 2005, p. 30-68. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2005.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. 1 ed. Jaboticabal: TecArt, 2004. Cap. 12, p. 343-386.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquacult*. v. 164. p. 351-358, 1998.

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

NIETO, T. P.; SANTOS, Y.; RODRÍGUEZ, L. A.; ELLIS, A. E; An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microbial Pathogenesis*. v.11, n.2, 1991, p.101-110.

NORD, C.E.; SJOBERG, L.; WADSTROM, T.; WRETLIND, B. Characterization of three *Aeromonas hydrophila* and nine *Pseudomonas* species by extracellular enzymes and haemolysis. *Medical Microbiology and Immunology*. v. 161. p. 79-87, 1975.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3º Ed. Maringá: Eduem, 2008. p. 311

POPMA, T.J.; LOVSHIN, L.L. Worldwide prospect for commercial production of tilapia. Auburn: ICLARM / Auburn University, 1994, 40 p.

RIBEIRO, M.E.A. Caracterização de *Aeromonas* spp. Isoladas de águas não tratadas para consumo humano. Vila Real, Portugal: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2008. 112p. Dissertação (Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial), 2008.

REQUE, V.R. Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Jaboticabal, SP, UNESP. 2005, p.1-63. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, 2005.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E.; BELO, M.A.A.; MORAES, F.R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. Aquaculture. v.300, p.37-42, 2010.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. Nutrition Reviews, 2003. Vol 61, nº 13 p. 91-99.

SEPE, A., BARBIERI, P., PEDUZZI R., DEMARTA, A., 2008. Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Appl Microbiol*, 46, 439-444.

SILVA, R.M.L. Bactérias do gênero *Aeromonas hydrophila* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da Região da Baixada Ocidental Maranhense. Jaboticabal, SP; USP. 2010, p. 91. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

STOSKOPF, M.K. Fish medicine. Philadelphia: Saunders, 1993, p.269-277.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilápia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. Bioscience Journal, v.10, n.1, p.107-114, 2003.

TANNOCK, G.W. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: MACKIE, R.I.; WITH, B.A.; ISAACSON, R.E. (Eds), Gastro intestinal Microbiology. v. 2. p. 434-465, 1997.

THUNE, R.L.; JOHNSON, M.C.; GRAHAM, T.E.; AMBORSKI, R.L. *Aeromonas hydrophila* –haemolysin: Purification and examination of its role in virulence of O-group channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque. Journal of Fish Diseases. V. 9. P. 5-62, 1986.

TREWAVAS, E. Tilapias: taxonomy and speciation. In: PULLIN, R.V.S. and LOWE-McCONNELL, R.H. The Biology and Cultured of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, n. 7, p. 3-13, 1982.

VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO, F.; ANDLID, T.; GUSTAFSSON, L.; WADSTROM, T. The expression of potencial colonisation of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Canadian Journal of Microbiology. v.39, 1993,p. 1135-1141.

ANEXOS



Figura 2. Coleta de sangue através da veia caudal.



Figura 3. Abertura do abdômen para coleta do intestino.

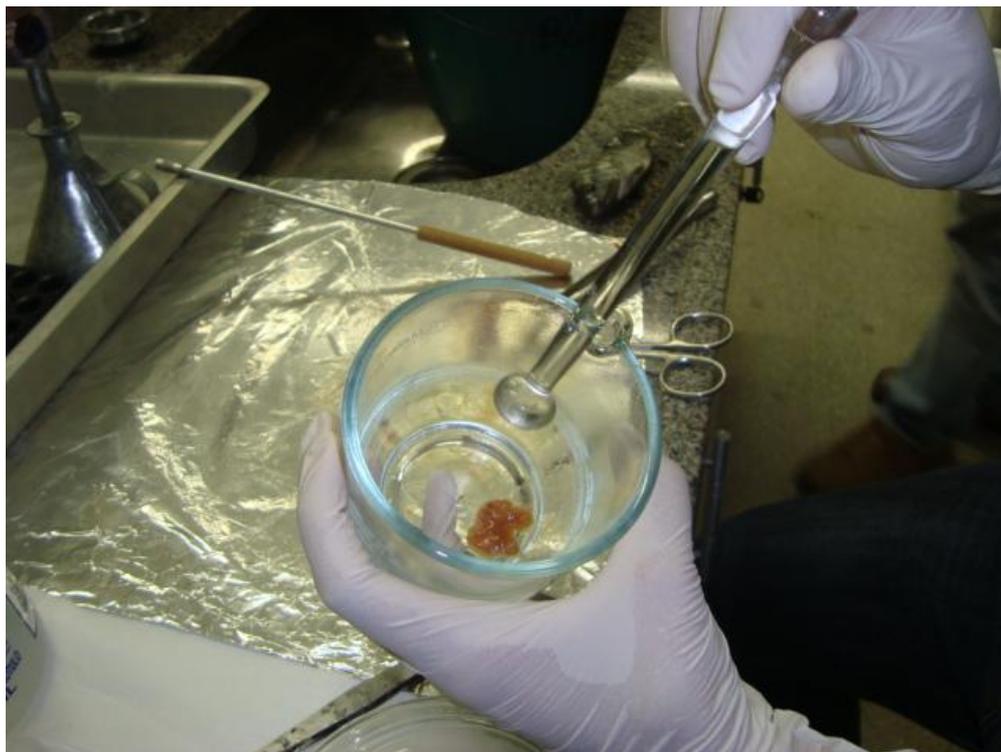


Figura 4. Maceração do intestino.



Figura 5. Cultivo de *A. hydrophila* em meio TSA para preparação do inóculo.



Figura 6. Mistura de *A. hydrophila* em solução salina.



Figura 7. Escala de Mc Farland padrão para a concentração de 10^8 UFC/ml.



Figura 8. Inoculação 1 ml de inoculo de *A. hydrophila*.