**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL**

DANIEL EMANOEL TORRES

**Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre o
desempenho zootécnico, hematológico e tolerância ao estresse
da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)**

Lorena – SP
2014

DANIEL EMANOEL TORRES

Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre o desempenho zootécnico, hematológico e tolerância ao estresse da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
Outubro, 2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Torres, Daniel Emanuel

Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre o desempenho zootécnico, hematológico e tolerância ao estresse da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). / Daniel Emanuel Torres. –ed. reimpr., corr.– 2014.
98 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Probióticos 2. *Lactobacillus* 3. Truta arco-íris 4. Desempenho zootécnico 5. Estresse de manejo. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient.

579.864 - CDU

BIOGRAFIA

Daniel Emanuel Torres nasceu no dia 06 de outubro de 1980, na cidade de Barra Mansa/RJ. Em 1997, aos 16 anos, ingressou no curso técnico de Análises Clínicas no Instituto Batista Americano – CIBA Volta Redonda/RJ. Durante e após este curso teve oportunidade de estagiar e trabalhar em laboratórios de análises, vivenciando as diversas áreas da rotina clínica.

No ano de 2000, começou a cursar Ciências Biológicas no Centro Universitário de Barra Mansa – UBM/RJ. Durante a graduação, estagiou no laboratório de microbiologia, onde desenvolveu a título de monografia, pesquisa sobre a capacidade de transferência de genes de resistência a antimicrobianos de *Lactobacillus* isolados da microbiota humana para bactérias patogênicas.

Após a graduação, em 2004, iniciou carreira como docente, e neste ínterim, especializou-se em Educação Ambiental, área que atua desde então.

No ensejo de continuar sua formação profissional, em 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial - Departamento de Biotecnologia, da Escola de Engenharia de Lorena - EEL / USP, na área de Microbiologia Aplicada. Nesta oportunidade desenvolveu projeto de pesquisa junto ao Laboratório de Probióticos, utilizando como modelo experimental a truta arco-íris com vistas a estudar o efeito de microrganismos probióticos sobre o desempenho desta espécie.

Dedico esta pequena, porém importantíssima
conquista à minha esposa Liliane.

A palavra apoio não faz jus à imensa força que
me fez alcançar esse sonho.

Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador – Professor Dr. Ismael Maciel de Mancilha pela confiança depositada e pelo apoio nesse projeto.

A pesquisadora Dra. Yara Aiko Tabata da Estação Experimental de Salmonicultura “Ascânio de Faria”, por ceder toda a infraestrutura do Instituto de Pesca para a realização deste experimento.

A grande amiga Yara Aiko Tabata, pelo incondicional apoio técnico, intelectual e braçal, imprescindível à execução desse projeto, em todas as horas que precisei.

Aos técnicos da Estação Experimental de Salmonicultura “Ascânio de Faria”, Rosana Aparecida da Silva, Luiz Roberto da Silva e Antônio Donizete da Silva pela imensa contribuição na manutenção dos experimentos.

Aos amigos Rosana Aparecida da Silva, Luiz Roberto da Silva e Antônio Donizete da Silva pela paciência, pelas conversas animadas, e pela ajuda incondicional em todos os momentos que precisei.

A estagiária Renata da Estação Experimental de Salmonicultura “Ascânio de Faria” pela grande ajuda nas coletas.

A professora Dra. Maria das Graças Almeida Felipe por ceder gentilmente às instalações e equipamentos do laboratório.

A grande pessoa e pesquisadora Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva pela ajuda com as identificações das células.

Ao amigo Msc. Flávio Ferraz por me ajudar em muitos momentos no laboratório e me acompanhar em várias viagens para Campos do Jordão, trabalhando o dia todo, nas coletas. Quando eu pensava que encararia sozinho todo o trabalho, o Flávio se virava e me acompanhava... Esse é o “cara”! Parceirão!

A amiga e cunhada, Dr.^a Tatiane Sueli Coutinho, pela grande ajuda e pelo exemplo.

Ao amigo Msc. Cláudio Donato por todo apoio e paciência dedicada no laboratório. Ajudou em tudo. Espero poder retribuir.

A todos os alunos companheiros da Pós-Graduação, em especial aos parceiros, Orerves, Diogo e Joana Mona. Admiro a todos.

A minha esposa Liliane que soube me ouvir quando precisei... Mesmo me repreendendo às vezes... Seu amor e companheirismo são únicos.

As minhas filhas Isabela e Milena por me trazerem a cada momento alegrias e a satisfação de ser pai. Estou aqui por vocês!

Agradeço especialmente aos meus pais, Edson e Maria. As palavras sinceras e conselhos são sempre um acalanto. Vou sempre ouvi-los... Sempre...

A toda minha família, principalmente meus irmãos, Rafael e Gabriel, que estiveram presentes nessa etapa, me apoiando, me entendendo e me incentivando a continuar na luta.

A todos que fizeram direta ou indiretamente parte da minha vida para tornar esse sonho possível.

OBRIGADO A TODOS!!!

Serenidade eu vim buscar aqui

E aprender a ser feliz.

Ter coragem de mudar,

O que pode ser mudado.

Aceitar o que não muda,

Impossível de mudar.

Pe. João Címaco Cabral

RESUMO

Torres, D.E. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre o desempenho zootécnico, hematológico e tolerância ao estresse da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Dentre as espécies exóticas de peixes produzidas no Brasil, a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, tem se destacado. Diante da expansão desse setor, intensifica-se a necessidade de estudos visando à diminuição dos problemas produtivos e sanitários apresentados na piscicultura, assim como a busca por tratamentos alternativos aos controversos antimicrobianos. Nesse contexto, o uso de probióticos, constituídos por microrganismos vivos, que quando consumidos adequadamente beneficiam a saúde do hospedeiro, demonstra ser uma abordagem promissora no aprimoramento na criação de trutas. Deste modo, o presente trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa na criação de truta arco-íris, avaliando o efeito de preparações probióticas sobre o desempenho dos animais submetidos às condições convencionais de manejo ou de estresse crônico. O estresse consistiu em aumentar diariamente o adensamento dos tanques de 15k g/m³ para 45 kg/m³ por 90 minutos. O tratamento consistiu na avaliação de um *pool* de células composto por 4 cepas de *Lactobacillus* com propriedades probióticas, que foi incorporado à alimentação por meio de veículo oleoso, totalizando 4 x 10⁸ UFC/g de ração. O delineamento experimental consistiu na utilização de 140 trutas com peso médio de 360,8 ± 22,67 g e comprimento de 30,2 ± 0,8 cm, mantidas em tanques de 1500L e distribuídas em 4 grupos, a saber: Grupo NR – ração controle; Grupo ER – estresse de manejo e ração controle; Grupo NP – ração contendo a preparação probiótica; Grupo EP – estresse e ração contendo a preparação probiótica. Foram coletados 8 indivíduos de cada grupo nos dias inicial, 30 e 60 para avaliação das variáveis hematológicas, bioquímicas e de desempenho zootécnico. A possibilidade de incorporação de cepas probióticas, não liofilizadas, na ração extrusada de peixes foi demonstrada. Os resultados mostraram que a suplementação da dieta de truta com probiótico aumentou significativamente (P<0,05) a contagem de eritrócitos e monócitos. Não foram observadas alterações estatisticamente discerníveis nos parâmetros bioquímicos e no desempenho, bem como não ficou comprovado que o tratamento avaliado mitigou as respostas de estresse.

Palavras-chave: Probióticos. *Lactobacillus*. Truta arco-íris. Desempenho zootécnico. Estresse animal.

ABSTRACT

Torres, D.E. **Evaluation of the effect of probiotic microorganisms on growth performance, hematological and stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. 2014. 98 p. Dissertation (M.Sc.) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Among the exotic species of fish produced in Brazil, the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has excelled. Given the expansion of this sector, intensifies the need for studies to decrease production and health problems presented in aquaculture, as well as the search for alternatives to controversial antimicrobial treatments. In this context, the use of probiotics and consist of live microorganisms, that when properly consumed benefit the health of the host, proves to be a promising approach to the improvement in the creation of trout. Thus, the present study sought to contribute to the development of an alternative technology in creating rainbow trout, evaluating the effect of probiotic preparations on the performance of the animals subjected to conventional management conditions or chronic stress. The stress consisted of daily increasing densification of 15k g/m³ tanks to 45 kg/m³ for 90 minutes. The treatment consisted in evaluating a pool of cells composed of four *Lactobacillus* strains with probiotic properties, was incorporated by feeding oil vehicle, totaling 4 x 10⁸ CFU/g of feed. The experiment consisted in using 140 trout with an average weight of 360.8 ± 22.67 g and length of 30.2 ± 0.8 cm, kept in tanks of 1500L and divided into 4 groups, namely: NR Group - feed control; CWT - stress management and diet control; NP Group - feed containing probiotic preparation; EP group - stress and diet containing the probiotic preparation. Were collected eight subjects in each group in the initial, 30 and 60 for assessment of hematological, biochemical and growth performance variables. The possibility of incorporating not freeze-dried probiotic strains in extruded fish feed was demonstrated. The results show that dietary supplementation with probiotic trout increased significantly (P <0.05) the erythrocyte count and monocytes. No statistically discernible changes in biochemical parameters and performance were observed, and it was not proven that evaluated treatment mitigated the stress response.

Keywords: Probiotics. *Lactobacillus*. Rainbow trout. Production performance. Animal stress.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO REFERENTES AOS NÍVEIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA ENTRADA E SAÍDA DE CADA TANQUE DURANTE O EXPERIMENTO COM TRUTA <i>Oncorhynchus mykiss</i> , ALIMENTADAS COM DIETA CONTENDO PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A ESTRESSE DE MANEJO.	56
TABELA 2 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS BIOMÉTRICOS E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM EXPERIMENTO COM TRUTA <i>Oncorhynchus mykiss</i> , ALIMENTADAS COM DIETA CONTENDO PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A ESTRESSE DE MANEJO.	59
TABELA 3 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE TRUTA <i>Oncorhynchus mykiss</i> , ALIMENTADAS COM DIETA CONTENDO PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A ESTRESSE DE MANEJO.	62
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DAS CONTAGENS ABSOLUTAS DE LEUCÓCITOS DURANTE O EXPERIMENTO COM TRUTA, <i>Oncorhynchus mykiss</i> , ALIMENTADAS COM DIETA CONTENDO PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A ESTRESSE DE MANEJO.	66
TABELA 5 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL E GLICOSE EM TRUTAS <i>Oncorhynchus mykiss</i> , SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS.	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EFEITO DE BACTÉRIAS NÃO PATOGÊNICAS NO TRATO INTESTINAL	24
FIGURA 2 – A. TANQUES UTILIZADOS NO EXPERIMENTO; B. DISPOSITIVO UTILIZADO PARA REGULAR A VAZÃO DE SAÍDA DOS TANQUES.	46
FIGURA 3 – PREPARO DO “POOL” DE LACTOBACILLUS. A. ETAPA DE CENTRIFUGAÇÃO; B. DESCARTE DO SOBRENADANTE; C. RESSUSPENSÃO E HOMOGENEIZAÇÃO DE CÉLULAS EM VÓRTEX.	48
FIGURA 4 – INCORPORAÇÃO DA PREPARAÇÃO PROBIÓTICA NA RAÇÃO. A- SUSPENSÃO DE CÉLULAS; B- INOCULAÇÃO DA SUSPENÇÃO NA RAÇÃO SOB ROTAÇÃO; C- MISTURADOR CIRCULAR.	48
FIGURA 5 - A- IDENTIFICAÇÃO; B- PESAGEM; C- BIOMETRIA; D- COLETA SANGUÍNEA.....	51
FIGURA 6 - VARIAÇÃO DA POPULAÇÃO DAS CEPAS PROBIÓTICAS INCORPORADAS NA RAÇÃO	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A TRUTA ARCO-IRIS (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i> - WALBAUM, 1792)	20
2.2 PROBIÓTICOS	21
2.2.1 <i>Definições e Histórico</i>	21
2.2.2 <i>Mecanismo de Ação dos Probióticos</i>	23
2.2.3 <i>Características do Gênero Lactobacillus</i>	25
2.2.4 <i>Alimentos Probióticos</i>	25
2.3 PROBIÓTICOS NA PISCICULTURA	27
2.3.1 <i>O Ambiente Microbiano na Aquicultura</i>	27
2.3.2 <i>Microbiota do Trato Gastrointestinal da Truta Arco-Íris</i>	30
2.3.3 <i>Probióticos como Alternativa aos Antimicrobianos</i>	32
2.3.4 <i>Desempenho Zootécnico X Probióticos</i>	34
2.3.5 <i>Parâmetros Hematológicos X Probióticos</i>	38
2.3.6 <i>Estresse no Ambiente de Produção X Probióticos</i>	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 ANIMAIS	44
3.1.1 <i>Acondicionamento dos peixes e aclimação</i>	44
3.1.2 <i>Seleção e identificação dos animais</i>	44
3.1.3 <i>Manejo dos tanques</i>	45
3.1.4 <i>Indução de estresse</i>	45
3.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	47
3.3 PREPARO DO “POOL” DE <i>LACTOBACILLUS</i>	47
3.4 INCORPORAÇÃO DA PREPARAÇÃO PROBIÓTICA NA RAÇÃO	48
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.6 BIOMETRIA, COLETA DE SANGUE E TECIDOS	50
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	51
3.7.1 <i>Determinação do Comprimento e do Peso dos Animais</i>	51
3.7.2 <i>Determinação dos parâmetros hematológicos</i>	52
3.7.3 <i>Determinação dos níveis de cortisol e glicose</i>	53
3.7.4 <i>Determinação do nível de oxigenação e temperatura média da água</i>	54
3.7.5 <i>Desempenho Zootécnico</i>	54
3.8 ANÁLISES DOS RESULTADOS	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA	56
4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS PROBIÓTICOS NA RAÇÃO	57
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DAS TRUTAS	58
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O ERITROGRAMA DAS TRUTAS	61
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O LEUCOGRAMA DAS TRUTAS.....	65
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE A CORTISOLEMIA E GLICEMIA DAS TRUTAS	69
5 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES.....	86

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é a atividade zootécnica que mais cresce no âmbito da produção de alimentos de origem animal, o que poderá colocar este setor à frente dos demais setores, gerando renda, emprego e fontes proteicas de qualidade para a população. Segundo dados da FAO-ONU (2012) a produção mundial de pescado, oriunda das atividades extrativa e da aquicultura, apresentou crescimento superior a 10% entre 1998 e 2011, sendo estimada a produção de 154 milhões de toneladas de pescado para 2011. Desse total, 63,6 milhões de toneladas correspondem à produção aquícola. A Ásia lidera a produção aquícola com 89% do total, sendo que 61,4% correspondem à produção chinesa. As Américas ocupam a segunda colocação (4,3%), seguido da Europa (4,2%), África (2,2%) e Oceania (0,3%).

Em 2011, o Brasil, segundo maior produtor sul-americano, produziu 628 mil toneladas, o que corresponde a menos de 1% da produção aquícola mundial. No entanto, o país apresenta grande potencial a ser explorado, por sua ampla extensão territorial, clima favorável e disponibilidade de recursos hídricos. Na produção nacional, destacam-se as espécies nativas o tambacú (híbrido), tambaqui, curimatá e pacu, e entre os exóticos a tilápia, carpa e a truta arco-íris (BRASIL, 2012).

A truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), destaca-se pelo apreciado sabor e qualidade nutricional de sua carne, foi introduzida na década de 1940, aclimatando-se perfeitamente nas águas frias de regiões serranas do Sudeste e Sul no Brasil. O pleno conhecimento de seu manejo, sua adaptabilidade em regiões não exploradas pela piscicultura, bem como o alto valor agregado a sua carne e derivados, fomentou grande interesse em sua produção ao nível nacional, a qual exibiu aumento de 29,3% no triênio 2008-2010 (BRASIL, 2012).

No entanto, o desenvolvimento da aquicultura tem sido acompanhado de um significativo aumento no surgimento de doenças, principalmente bacterianas, gerando altas taxas de mortalidade e prejuízo da produtividade nos criadouros. Tais enfermidades aumentam proporcionalmente com o aumento da densidade

de animais nos tanques devido ao manejo intensivo, o que ocasiona uma elevada produção de resíduos pelos animais, que é influenciada pela quantidade e qualidade dos alimentos. A má qualidade da água representa outro importante fator que provoca estresse, afetando o sistema imunológico dos animais, e predispondo-os ao surgimento de doenças, que comprometem o desempenho zootécnico, levando a prejuízos para a produção.

O aumento da incidência de doenças bacterianas e a busca por uma melhoria na produtividade desencadeiam o uso indiscriminado de antimicrobianos como medida profilática ou como promotores de crescimento. Este procedimento pode acarretar o surgimento de microrganismos patogênicos multi-resistentes, por pressão seletiva que favorece as variantes mais resistentes e o fluxo horizontal de genes de resistência por plasmídeos. Além disso, existe o risco dessa resistência ser transmitida às espécies nativas e aumentar a quantidade de resíduos na carne e seus derivados. Além da questão relacionada à sanidade, existe também a dificuldade de se conquistar o comércio exterior, pois o uso de promotores de crescimento e antimicrobianos como medida profilática, tem dificultado à exportação de produtos cárneos. Tal medida pode ser verificada na moratória adotada pela União Europeia no tocante a proibição da incorporação de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal (PARLAMENTO EUROPEU, 2003).

Diante do desafio de aperfeiçoar a produtividade aquícola, com efeitos igualmente benéficos sobre o ambiente e a saúde humana, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis que assegurem uma abordagem ecossistêmica no uso de recursos naturais e estabilidade econômica.

As pesquisas concentram-se em combater doenças, atingindo desempenho zootécnico satisfatório e reduzindo a dependência aos antimicrobianos. Dentre as pesquisas, destacam-se as técnicas de biorremediação, uso de vacinas e compostos imunoestimulantes, além de alimentos funcionais como prebióticos e probióticos. Os benefícios conferidos pelos microrganismos probióticos cujos principais mecanismos de ação se baseiam na modulação da microbiota intestinal e no estímulo a resposta imune, correspondem a uma nova abordagem na piscicultura e tem sido demonstrada

como uma alternativa promissora na produção aquícola. A incorporação de espécies de microrganismos probióticos na ração de peixes tem provocado melhorias na conversão alimentar, desempenhando função terapêutica, profilática e promotora de crescimento. Além disso, esse procedimento pode contribuir para mudanças positivas no perfil microbiológico do ambiente de criação com redução do surgimento de doenças oportunistas, o que favorece as condições sanitárias da criação.

Contudo, os benefícios das preparações probióticas dependem de uma série de fatores, como as espécies de microrganismos, a forma de veiculação, a frequência do tratamento e a espécie de animal submetido ao tratamento. Desta forma, novos estudos são necessários tendo em vista a avaliação de efeitos de diferentes cepas de microrganismos probióticos sobre as várias espécies de peixes exploradas comercialmente, visando contribuir para padronização sustentável da produtividade aquícola.

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para a criação de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por meio do emprego de uma preparação probiótica incorporada à dieta dos animais, visando o seu melhor desempenho zootécnico e sua maior tolerância ao estresse. Especificamente, investigou-se o efeito de espécies de *Lactobacillus*, na forma de um “pool” de cepas, sobre o desempenho zootécnico, parâmetros hematológico, bioquímicos e tolerância ao estresse, por meio de avaliação da biometria, hematologia e as concentrações de cortisol, e glicose plasmáticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A TRUTA ARCO-IRIS (*Oncorhynchus mykiss* - WALBAUM, 1792)

A truta arco-íris é originária dos rios da vertente Pacífica da América do Norte, pertence à ordem Salmoniformes, família Salmonidae, sendo a espécie de peixe de águas frias, mais difundida nos diferentes países (HERSHBERGER, 1992). É considerado um peixe nobre, de sabor delicado e de excelentes qualidades nutricionais, visto que apresenta elevado teor proteico, vitaminas, sais minerais, além de ser fonte de Ω -3 (Ômega 3), e ácidos graxos insaturados responsáveis pela redução dos níveis de colesterol no sangue (NUTRITION DATA, 2013).

Segundo Tabata e Portz (2004), a ampla distribuição mundial é justificada por ser uma espécie que apresenta capacidade de sobrevivência e reprodução em ambientes naturais como rios e represas, como também em tanques, tanques-rede e laboratórios de incubação. Seu grande potencial produtivo é evidenciado pelo consumo de alimento industrializado desde a fase de alevino, alcance da maturidade sexual em cativeiro e seu elevado valor. Tais potencialidades fizeram da truta uma das mais estudadas dentre as espécies exploradas comercialmente.

A década de 1950 foi considerada marcante para introdução desta espécie em território Brasileiro, por iniciativa do Ministério da Agricultura para enriquecer os rios das regiões serranas, pobres em fauna aquática nativa. De acordo com Proença et al. (2001), o sucesso da introdução da truta no Brasil é devido à semelhança das águas frias, concentradas em áreas serranas das regiões sul e sudeste, com a água dos rios de seu ambiente natural. Os autores relataram que nestas áreas de mananciais pobres em fauna aquática, a truticultura desempenha um importante papel social e econômico, pois viabiliza pequenas propriedades rurais em regiões de baixa densidade demográfica, além de ser também uma boa opção para grandes empreendimentos. A truticultura pode ainda ser associada ao turismo como estratégia para viabilizar a cadeia produtiva e tornar o setor competitivo, agregando valores ao peixe e seus derivados, por meio da pesca esportiva, da culinária e do ecoturismo (PROENÇA et al., 2001; SOSINSKI, 2004).

Conforme reportado no Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012), a truta representa 1,3% do total da produção aquícola brasileira.

Com 2,19 mil toneladas, produzidas em 2007, a produção nacional saltou para 5,12 mil toneladas registradas em 2010, tendo sido registrado uma importação do Chile de 1,02 mil toneladas/ano.

Segundo estimativa da Associação Brasileira de Truticultores (DIAS, 2000), existe um mercado para a comercialização da truta que é praticamente inexplorado nas capitais dos Estados e nas grandes cidades do interior onde se observa um bom nível socioeconômico. Para Porto-Foresti et al. (2002), um dos principais problemas apontados pelos truticultores brasileiros reside na comercialização, cuja situação é agravada pela concorrência de produtos importados cada vez mais presentes no mercado interno. Os autores relataram ainda que, para se ter competitividade neste setor, além do aumento da produtividade e da diversificação de produtos com valor agregado, é fundamental que se tenha qualidade certificada, para que os produtos e os sistemas da truticultura atendam aos padrões internacionais de qualidade.

2.2 PROBIÓTICOS

2.2.1 Definições e Histórico

O termo Probiótico é construído a partir da expressão Latina *PRO* (para) e da palavra Grega *BIOS* (vida) (ZIVKOVIĆ, 1999). Assim, Lilly e Stiwell (1965) definiram probióticos pela primeira vez como sendo “um fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos”. Parker (1974), ao observarem a modulação da microbiota em animais submetidos a dieta contendo bactérias fermentativas comensais, denominaram probióticos como sendo “substâncias que contribuem para um balanço intestinal adequado”. Um significado clássico e amplamente aceito, foi proposto por Fuller (1989), como “suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio de equilíbrio da microbiota intestinal”. Salminen et al. (1999) designaram probióticos como “preparados de microrganismos, ou seus componentes, que apresentam efeitos benéficos sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro”.

De forma mais abrangente Schrezenmeir e Vrese (2001) definiram probióticos como sendo “uma preparação ou um produto contendo microrganismos viáveis, definidos em concentração suficiente para alterar a microbiota (por implantação ou colonização), num sítio do hospedeiro, exercendo efeitos sobre sua saúde”.

Em 2001, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) propôs a seguinte definição para probióticos: “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro”.

No contexto histórico, a partir do aperfeiçoamento das técnicas em microbiologia, alguns pesquisadores (SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M., 1998¹; TISSIER, 1906; METCHNIKOFF, 1907) atribuíram efeitos positivos sobre a saúde, promovidos pelo balanço na microbiota intestinal. O antagonismo de certas espécies comensais de bactérias sobre espécies patogênicas foi demonstrado *in vitro* por Carre (1887). Mechnikoff (1907) postulou que o consumo de iogurte contendo lactobacilos resulta em redução da população de espécies de bactérias produtoras de toxinas no intestino, aumentando com isso a longevidade do indivíduo. No mesmo período, o restabelecimento da microbiota intestinal de pacientes com diarreia era proposto por Tissier (1906) por meio da administração de bifidobactérias, presentes em abundância no intestino de lactentes saudáveis. Kopeloff (1926) e Rettger et al. (1935) observaram a regeneração da microbiota intestinal com efeitos benéficos sobre as funções digestivas, por meio da administração de uma cepa de *Lactobacillus acidophilus*. Os autores verificaram ainda a capacidade de sobrevivência desta espécie no intestino, o que não era observado com as espécies de bifidobactérias.

O papel significativo da microbiota intestinal na resistência a doenças foi demonstrado por Bohnhoff et al. (1954), ao observarem que uma quantidade pequena de bactérias patogênicas ($\leq 10^1$) levavam a óbito camundongos que tiveram a microbiota intestinal alterada por antibióticos, enquanto uma quantidade

¹ (apud CARRE, U.C. Antagonisten unter den Bacterien. **Correspondenz-Blatt fuer Schweizer Aerzte**, v. 17, p.386-385, 1887)

maior destas mesmas bactérias ($> 10^9$) era necessária para causar infecção em camundongos que apresentavam a microbiota normal.

Entretanto, como as primeiras tentativas de aplicação comercial desses agentes microbianos, apesar de atraentes, nem sempre tiveram resultados positivos, a aceitação dos probióticos não foi amparada pela comunidade científica da década de 1950 (FAO, 2001).

A partir da década de 1980, a pesquisa na área de probióticos progrediu consideravelmente, e avanços significativos ocorreram na seleção e caracterização de determinadas culturas probióticas, às quais são atribuídos efeitos sobre a saúde dos consumidores (HAVENAAR; HUIS, 1992, GUARNER; SCHAAFSMA, 1998).

2.2.2 Mecanismo de Ação dos Probióticos

Os microrganismos probióticos exercem efeitos diversos sobre a saúde mediante distintos mecanismos de ação. Ao aderir aos sítios específicos localizados no epitélio intestinal, se dá o início de suas atividades metabólicas com consequente modulação da microbiota, proporcionando efeitos benéficos para o hospedeiro (LORENTE; SERRA, 2001).

Segundo Balcázar et al. (2006), o fortalecimento da resistência à colonização ou inibição direta contra agentes patogênicos são efeitos importantes atribuídos aos microrganismos probióticos, resultando em menor incidência e prevalência de doenças. Espécies probióticas demonstram ser capazes de inibir espécies de bactérias patogênicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, por diferentes mecanismos. Os autores esclarecem que na maioria dos estudos, estes mecanismos de inibição ainda não são completamente entendidos, e que isso se deve às dificuldades metodológicas e éticas ligadas ao estudo com animais.

No entanto, alguns benefícios resultantes da administração de preparações probióticas a peixes foram propostos como: exclusão competitiva de bactérias patogênicas (GARRIQUES; AREVALO, 1995; MORIARTY, 1997; GOMEZ-GIL et

al., 2000;. BALCÁZAR, 2003; BALCÁZAR et al., 2004;. VINE et al., 2004); síntese de nutrientes e enzimas que facilitam a digestão (SAKATA, 1990; PRIEUR et al., 1990; GARRIQUES;e AREVALO, 1995); absorção de material orgânico dissolvido mediada pelas bactérias (GARRIQUES, AREVALO, 1995; MORIARTY, 1997); melhoria da resposta imune contra patógenos (ANDLID et a., 1995; SCHOLZ et al., 1999; RENGPIPAT et al., 2000; GULLIAN e RODRÍGUEZ, 2002; IRIANTO; AUSTIN, 2002; BALCÁZAR, 2003; BALCÁZAR et al., 2004); efeitos antivirais (KAMEI et al., 1988; GIRONES et al., 1989; DIREKBUSARAKOM et al., 1998).

De acordo com Ferreira e Kussakawa (2010), os mecanismos de ação probiótica que promovem equilíbrio da microbiota intestinal e consequentemente, trazendo diversos benefícios ao hospedeiro (Figura 1).

Figura 1 - Efeito de bactérias não patogênicas no trato intestinal

2.2.3 Características do Gênero *Lactobacillus*

De acordo com o Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, o gênero *Lactobacillus* compreende bactérias na forma de bacilos, regulares e não esporulados e apresentam morfologia celular variando de bacilos longos, finos, curvados ou pequenos, sendo em sua totalidade gram-positivos.

O gênero compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas (GOMES; MALCATA, 2002), sendo algumas muito distantes geneticamente umas das outras e outras altamente relacionadas, variando na capacidade de fermentar diferentes tipos de carboidratos (BOTELHO, 2005). De acordo com Klaenhammer e Kullen (1999), 5 destas espécies apresentam subespécies, destacando *delbrueckii*, *aviarius*, *salivarius*, *coryniformis* e *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* as quais são espécies, isoladas de humanos, que exercem efeitos probióticos.

Botelho (2005) caracterizou as espécies de *Lactobacillus* como microaerófilos, apesar de algumas espécies também serem isoladas em anaerobiose. Quando cultivados em meios sólidos, apresentam melhor desenvolvimento em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzido e apresentando 5% a 10% de CO₂. Nos meios usuais de crescimento, os lactobacilos raramente produzem pigmentos que, quando presentes, são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo. Crescem em temperaturas que variam de 2 °C a 53 °C, com valores ótimos, geralmente, de 30 °C a 40 °C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2, podendo crescer em pH 5,0 ou menor.

2.2.4 Alimentos Probióticos

Saad (2006) salienta que as bactérias ácido-láticas são os principais microrganismos presentes nos alimentos funcionais para uso humano e animal, além de produtos farmacêuticos. Estas espécies são encontradas naturalmente

no trato gastrointestinal, no ambiente e em alimentos como vegetais, leite e carne. No trato gastrointestinal agem efetivamente como probióticos, aderindo ao epitélio intestinal e assim, colonizando-o (FULLER, 1989; SAAD, 2006). São caracterizadas como espécies que apresentam elevado requerimento nutricional, Gram-positivas, quase sempre catalase negativas, não formadoras de esporos e tem como característica o acúmulo de ácido láctico e outros ácidos orgânicos a partir do metabolismo de carboidratos. Quanto à necessidade de oxigênio podem ser anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas (MADIGAN et al., 2004).

Dentre as espécies de bactérias ácido-láticas que apresentam propriedades probióticas destacam-se as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GORBACH, 2002), além de espécies *Bacillus*, *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium freundendsreichii*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*. Segundo Charteris et al.(1998) dentre as leveduras destacam-se as espécies *Saccharomyces boulardii* e *S. cereviseae*, que são espécies correntemente utilizadas como probióticos em nível tecnológico. São não patogênicas e apresentam *status GRAS* (Geralmente Reconhecido como Seguros) podendo ser usadas em preparações na forma isolada ou na forma de um “pool” de cepas, bem como associados com enzimas com vistas a ampliar o espectro de ação do produto probiótico no consumidor (BOTELHO, 2005).

De acordo com Isoulari et al. (2004), microrganismos probióticos são aplicados comumente em produtos lácteos (leites fermentados, iogurtes e queijos). Os autores esclarecem que durante a fermentação desses produtos há considerável queda do pH, o que preserva o alimento e confere atributos sensoriais e propriedades funcionais. A palavra “funcional” atribuída a determinados alimentos denota seu maior valor como promotor de saúde e, segundo Stringheta et al. (2007), atribuiu-se o início de sua aplicação no Japão, o que teria acontecido devido à necessidade de agregar valor terapêutico aos alimentos e com isso atenuar gastos com saúde em uma população com elevada expectativa de vida.

Para Lourens-Hatting (2001), o desenvolvimento de produtos probióticos é crescente, assim como prebióticos², e a combinação entre eles, referida como simbióticos. Para Araújo (2007), o valor terapêutico desses produtos tem estimulado um incremento no comércio mundial de produtos desta natureza, sendo que, os benefícios alcançados em aplicações humanas são igualmente promissores nas aplicações em animais.

Probióticos, comercialmente vendidos para suplementação da alimentação de animais terrestres, têm sido testados para animais aquáticos através da incorporação de cepas probióticas na forma liofilizada (CORRÊA-JUNIOR et al., 2009).

2.3 PROBIÓTICOS NA PISCICULTURA

2.3.1 O Ambiente Microbiano na Aquicultura

Segundo Cahill (1990), os resultados das pesquisas de aplicações microbianas na aquicultura esclarecem a relação da microbiota intestinal com o habitat e a alimentação de animais aquáticos, ou seja, há evidência de que as bactérias presentes no ambiente aquático influenciam diretamente a composição da microbiota intestinal. Do mesmo modo as bactérias eliminadas pelas fezes influenciam o ambiente.

De acordo com Gram et al. (1999), as espécies microbianas presentes no trato gastrointestinal geralmente são aquelas, do meio ambiente ou da dieta, que podem sobreviver e multiplicar-se no hospedeiro. Os autores afirmaram que devido à condição em que vivem (em contato direto com a água), o imediatismo do ambiente exerce uma influência muito maior sobre o estado de saúde do que em animais terrestres. Assim, concluíram que as interações de hospedeiros e sua

² (componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon – Gibson e Roberfroid, 1995)

microbiota são qualitativamente e quantitativamente diferentes para as espécies aquáticas e terrestres.

Hansen et al.(1992) relatou que, contrariamente à maior parte dos sistemas terrestres, a água não é fator limitante para o desenvolvimento de microbiota no trato gastrointestinal assim como em outros órgãos como as brânquias, pele ou genitais, pois há condição favorável de umidade.

De acordo com Moriarty (1998), o ambiente aquático fornece um suporte muito maior a patógenos, independentemente de seus hospedeiros, elevando a quantidade de agentes oportunistas. Assim, o autor concluiu que microrganismos que colonizam animais aquáticos são continuamente veiculados tanto com a alimentação, respiração ou até mesmo com o contato com a água, o que faz do ambiente microbiano estável um ótimo fator para avaliar a sanidade do ambiente de criação.

Segundo Gomez-Gil (2000), o efeito de um microrganismo probiótico sobre o hospedeiro está atrelado à sua administração contínua e controlada. Entretanto, o autor ressaltou que a grande interação entre o ambiente de produção e o hospedeiro na aquicultura, implica na colonização por microrganismos com propriedades probióticas que são provenientes do próprio ambiente e não somente da alimentação. Em decorrência dessa observação, o autor ressalta que durante a década de 1990, novas terminologias para microrganismos em uso na aquicultura foram propostas, a fim de adequar as definições a seus respectivos empregos.

Conforme Maeda et al. (1997) e Moriarty (1998), agentes microbianos que apresentam propriedades antagonistas sobre espécies patogênicas e que não colonizam o trato gastrointestinal do hospedeiro são definidos como agentes de *controle biológico*. Para Moriart (1998) e Gatesoupe (1999), quando ocorrem melhorias da qualidade da água devido à ação microbiana sobre compostos poluentes trata-se de uma *biorremediação*. Para Spanggard et al. (2001), esses conceitos não se aplicam a agentes probióticos, mesmo proporcionando benefícios, uma vez que nestes casos não se observa a sobrevivência dos microrganismos no trato gastrointestinal do hospedeiro. Os autores salientam ainda que muitas das definições de probióticos para a aquicultura, mesmo

abordando os benefícios associados à saúde do hospedeiro, foram propostas com base nos efeitos causados por espécies de microrganismos existentes no meio aquático e não por intermédio de espécies provenientes da dieta.

Merrifield et al. (2010) propõem uma combinação de conceitos gerais para definir o uso desta tecnologia como sendo “uma aplicação de microrganismos, vivos ou mortos que, quando administrados via ração, trazem benefícios ao hospedeiro, por meio da melhoria da qualidade da água, em relação à resistência às doenças, ao estado de saúde do animal, bem como ao seu crescimento, desempenho, assimilação do nutrientes e resposta ao estresse, o que é conseguido em decorrência da manutenção de um equilíbrio positivo da microbiota do ambiente e do trato gastrointestinal do hospedeiro”.

De acordo com Wang et al. (2006), a procura por uma aquicultura sustentável provocou um amplo interesse pelo uso dos produtos probióticos. Os autores ressaltam que existe uma clara necessidade de se conhecer a microbiota intestinal dos peixes, bem como de se avaliar a eficácia de preparações probióticas. Desta forma, pesquisas têm sido conduzidas para se avaliar o efeito de novas cepas, bem como preparações probióticas específicas para aplicação em piscicultura (GÓMEZ; BALCÁZAR, 2008; BALCÁZAR et al., 2006; VINE et al., 2001; FARZANFAR, 2006; SPANGGAARD et al., 2001).

Neste sentido, Merrifield et al. (2010) propõem o agrupamento das características que devem ser consideradas na seleção de cepas e/ou preparações probióticos em essenciais e favoráveis. Dentre as características consideradas essenciais destacam-se: 1- não ser patogênico, ao hospedeiro e outros animais do meio aquático e ao consumidor; 2- não ter plasmídeos que codificam genes de resistência a antibióticos; 3- ser resistente aos sais biliares e baixo pH. Como favoráveis, os autores destacam: 1- ser capaz de aderir e/ou crescer no muco intestinal; 2- ser capaz de colonizar a superfície do epitélio intestinal; 3- ter registro para ser usado como aditivo alimentar; 4- exibir características de crescimento vantajosas (por exemplo, fase *lag* e *log* curtas, crescimento a temperaturas de criação do hospedeiro); 5- apresentar efeito antagonista sobre espécies patogênicas importantes na piscicultura tais como: *Aeromonas salmonicida*, *Listonela* sp., *Vibrio anguillarum* e *Yersinia ruckeri*); 6-

sintetizar vitaminas e enzimas digestivas extracelulares tais como quitinases e celulasas; 7- fazer parte da microbiota autóctone do hospedeiro ou do meio aquático; 8- permanecer viável em condições normais de estocagem e processamento industrial.

Patterson e Burkholder (2003) ressaltam que é pouco provável que se encontre espécies de microrganismos probióticos que apresentem todas as características mencionadas. Desta forma, sugerem que se avaliem preparações probióticas constituídas por mais de uma espécie de microrganismo, bem como acrescidas de compostos prebióticos, constituindo assim os alimentos simbióticos.

De acordo com Saad (2006), para serem de importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem alcançar populações acima de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL de bioproduto. Merifield et al.(2010), destaca que estudos com probióticos em salmonídeos são necessários para se estabelecer valores de referência para estas aplicações, uma vez que níveis apropriados podem variar de acordo com a espécie de microrganismo probiótico, espécie e estado de saúde do peixe hospedeiro. Além disso, é necessário que se estabeleça dosagens de produtos para objetivos específicos, como promoção de saúde, resistência às doenças e nutrição.

2.3.2 Microbiota do Trato Gastrointestinal da Truta Arco-Íris

Segundo Ingerslev et al. (2012), os peixes ao nascer são desprovidos de microbiota intestinal, pois nutrem-se das reservas do saco vitelínico, que é considerado estéril, e portanto, formam sua microbiota apenas quando o intestino se torna plenamente funcional. Os autores reportam ainda que a microbiota intestinal antes da primeira alimentação provém da água circundante. Assim, ao começarem a se alimentar, os peixes terão o primeiro contato das bactérias do alimento com o intestino. A microbiota adquirida com a alimentação por sua vez, virá a competir com a microbiota que se estabelece antes da alimentação.

Nieto et al. (1984) isolaram, a partir das guelras de truta arco-íris, espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, além de enterobactérias, corynebactérias e cocos Gram positivos.

A microbiota intestinal de trutas saudáveis, provenientes de criações Escocesas, foi avaliada por Austin e Al-Zahrani (1988), sendo identificadas espécies de *Pseudomonas* (12%), *Flavobacterim* (4%), *Corynebacterium* (12%), *Bacillus* (8%), *Aeromonas* (16%), *Micrococcus* (12%), além de espécies de *Enterobacteriaceae* (20%), *Acinetobacter* (8%) e *Staphylococcus* (8%).

Huber et al. (2003) identificaram que as Proteobactérias são dominantes na microbiota intestinal, porém, apresentando a contagem populacional variando de de indivíduo para indivíduo dentro da mesma espécie.

Com o objetivo de entender como é formada a comunidade microbiana no muco intestinal de trutas, Kim et al. (2006) isolaram espécies de 41 filos microbianos cultiváveis e 39 sequências de r-RNA 16S, além de 2 genes 18S r-RNA. Representantes das famílias *Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* estavam entre as bactérias cultivadas.

Estudos conduzidos por Navarrete et al. (2010), usando métodos de sequenciamento de DNA baseadas no gene 16S r-RNA, demonstraram que a microbiota de truta é dominada por *Lactococcus lactis*, *Citrobacter gillenii*, *Kluyvera intermedia*, *Obesumbacterium proteus* e *Shewanella marinus*.

Investigando a dinâmica da microbiota intestinal usando a truta como modelo, Ingerslev et al. (2012) verificaram uma alteração significativa na composição microbiota como resultado da mudança da alimentação. Na fase larval, a microbiota intestinal identificada foi dominada por espécies dos filos Bacteriodetes (46,1%), Proteobacteria (26,3%) e Firmicutes (13,4%). A população de Bacteriodetes decresceu para 19% após 26 dias da primeira alimentação e para 6% após 49 dias. enquanto que a população de Proteobacteria aumentou para 33,3% e 48,5% após 26 e 49 dias após primeira alimentação, respectivamente. Dentre as espécies de Firmicutes, verificou-se uma população correspondente a 31% e 30% após 26 e 49 dias no mesmo período. O gênero dominante dentre as espécies de Bacteriodetes, em todos os pontos de

amostragem, foi *Sediminibacterium*, uma bactéria ambiental normalmente encontrada no solo e nos sedimentos. Os autores ainda relataram que os Firmicutes, eram compostos pelas espécies dos gêneros *Clostridium* e *Lactobacillus*, enquanto o Proteobacteria, mais diversificado, consistiu principalmente de espécies de classe gama e, em menor número, de alfa e beta-classes.

2.3.3 Probióticos como Alternativa aos Antimicrobianos

Doenças virais e bacterianas são comuns em aquicultura, especialmente em criadouros altamente adensados. Para combater essas doenças e até mesmo preveni-las, o uso dos antibióticos foi então introduzido por meio da ração ou pela aplicação direta no meio aquático (ERVIK et al., 1994).

De acordo com Lancini (1994), os compostos antimicrobianos têm sido usados na fabricação de rações para diferentes espécies de animais desde os anos 1950, não só como medida terapêutica ou profilática, mas também como promotores de crescimento. Segundo o autor a utilização de antibióticos começou de maneira discreta, evoluindo posteriormente para o uso amplo e generalizado na indústria de alimentação animal. Relatou também que o uso prolongado de promotores de crescimento como moduladores de microrganismos do trato gastrointestinal tem induzido o surgimento de cepas resistentes às diferentes drogas.

Procedimentos como vacinação e antibioticoterapias têm sido propostos para curar ou prevenir doenças, entretanto muitas destas enfermidades permanecem endêmicas e se difundem acompanhando o crescimento das atividades aquícolas (RINGØ; GATESOUBE, 1998). Contudo, a utilização de compostos antimicrobianos, como promotores de crescimento, pertencentes ao mesmo grupo de drogas terapêuticas, determinou a manifestação de formas bacterianas resistentes e prejudiciais a saúde, assim como causou dificuldades para tratamentos de doenças. Este fato despertou a atenção das autoridades governamentais envolvidas com a saúde pública (EDENS, 2003).

Essa constatação foi determinante para que os países da Comunidade Econômica Europeia banissem uma série de antibióticos na alimentação animal, em especial na alimentação de aves, em função do surgimento de cepas resistentes a uma série de drogas (PARLAMENTO EUROPEU, 2003).

Segundo Edens (2003), a resistência a compostos com ação antimicrobiana pode ser decorrente: 1- da diminuição da absorção do antibiótico pela parede celular, anulando parcialmente ou totalmente o seu efeito; 2- do aumento da degradação metabólica da droga com sua transformação em produto não lesivo às bactérias; 3- da sua transformação em metabólitos alternativos que permite aos microrganismos uma coexistência com a droga.

Nesse contexto, outro problema decorrente do uso de agentes antimicrobianos é relatado por Bilandizic (2011), no que se refere à permanência de resíduos na carcaça dos animais tratados. O autor afirma que, em criadouros com alta demanda, os prazos seguros para eliminação desses resíduos não são respeitados ao se definir o abate.

Bilandizic et al. (2011) avaliou os níveis musculares de cloranfenicol em truta arco-íris alimentadas com ração contendo doses terapêuticas deste antimicrobiano por meio da ração. Os resultados encontrados sugerem que a carne da truta atinge níveis de cloranfenicol seguros para o consumo somente após 10 dias do encerramento do tratamento.

De acordo com Lu et al.(2009), resíduos de cloranfenicol em aquicultura podem ser um risco para a saúde pública, enquanto os resíduos na água e sedimentos prejudicam o ambiente aquático.

Alternativas para a aplicação de antimicrobianos como promotores de crescimento foram reportadas por Cabral (2006), que sugeriu o uso de ácidos orgânicos, bio-flavonóides, prebióticos e probióticos como solução para a melhoria no desempenho zootécnico e prevenção de doenças na criação de trutas.

Segundo Verschurele et al. (2000) a crescente preocupação no âmbito econômico e social, no tocante à diminuição no uso de antibióticos e outros produtos químicos utilizados na criação de peixes, têm incentivado o emprego de

técnicas ecológicas, com o objetivo de desenvolver estratégias para o controle microbiano.

Kubitza (2005) argumentou que uma abordagem preventiva na piscicultura é fundamental para evitar problemas de doenças, e que o uso de antimicrobianos gera preocupações com a biossegurança das produções aquícolas. O autor ressaltou ainda que diversos produtos com propriedades imunoestimulantes e probióticas estão disponíveis no mercado. Como a administração destes compostos é feita por meio dos alimentos, cabe aos fabricantes de ração, em parceria com criadores e pesquisadores, avaliarem e difundirem o uso desses como medida preventiva para reduzir os problemas com doenças e seus tratamentos na piscicultura.

Cepas que são usualmente usadas como probióticas em humanos, ao exemplo de *Lactobacillus* e *Enterococcus*, têm sido avaliadas para estudos em peixes como uma nova e segura forma de tratamento em piscicultura. (NIKOSKELAINEN et al., 2001).

2.3.4 Desempenho Zootécnico X Probióticos

De acordo com Merrifield et al. (2010), é crescente o número de aplicações probióticas na criação de trutas com vistas a se estudar o efeito dos microrganismos probióticos sobre o desempenho zootécnico, a conversão alimentar e o balanço da microbiota intestinal.

Avaliando uma preparação probiótica comercial, constituída de *Bacillus* sp., sobre o crescimento, sobrevivência e carga microbiana de trutas arco-íris, Bagheri (2008), constatou que esta espécie estimulou a conversão alimentar como consequência da produção de enzimas digestivas, resultando em melhor desempenho zootécnico.

Meurer ET AL. (2008) avaliou a influência da inclusão da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico em rações de tilápia do Nilo durante o

período de reversão sexual sobre o desempenho e a colonização intestinal, em um ambiente de baixo desafio sanitário. Apesar de ter sido verificada a colonização da levedura no intestino dos animais, não foi constatada melhorias no desempenho e na sobrevivência.

Gonçalves (2009) avaliou o efeito de dietas contendo probiótico (não especificado) e espirulina em tambaqui *Colossoma macropomum*. Foi observado maior sobrevivência no grupo tratado com probióticos sob desafio de densidade e por implante sub-cutâneo de lamínula, assim como melhor recuperação da lesão causada pelo implante. No entanto não foram observadas alterações nas variáveis imunológicas, hematológicas e bioquímicas.

Merrifield et al. (2010) avaliaram o desempenho zootécnico de trutas suplementadas com ácido oxolínico, posteriormente submetidas a uma dieta suplementada com o probiótico composto por *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Enterococcus faecium*. Os resultados demonstraram que houve uma significativa melhora na conversão alimentar, taxa de crescimento e eficiência proteica, sendo demonstrado o potencial dos probióticos na modulação da microbiota gastrintestinal dos animais após a antibioticoterapia.

O produto probiótico PAS TR[®], composto por Cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus taylori* foi avaliado na alimentação extrusada e peletizada de tilápias por Nakandakare (2010). Foram constatados elevados níveis de sobrevivência (até 100%) entre os grupos tratados com o produto, no entanto, não houve melhorias no ganho de massa.

Dias (2010) avaliou a influência do probiótico composto de *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo do peixe conhecido como matrinxã (*Brycon amazonicus*) nas diferentes fases de desenvolvimento, incluindo reprodução, larva e engorda. Os resultados evidenciaram que as matrizes que receberam a dieta suplementada com probiótico apresentaram aumento do número de ovócitos e, conseqüentemente, aumento nas taxas de fertilização e eclosão das larvas. Os peixes tratados com probiótico apresentaram maior peso final, como consequência do aumento das taxas de crescimento específico e melhora na conversão alimentar aparente. Também foi constatado que a inclusão de 10g de

probiótico por quilo de ração reduziu a deposição de lipídios no músculo e alteraram positivamente os parâmetros hematológicos, níveis de cortisol e glicose.

O efeito do probiótico comercial GroBiotic®-A, composto prebióticos, juntamente com células lisadas de *Saccharomyces cerevisiae*, foi avaliado por Azari et al. (2011), verificando-se o crescimento e a modulação da microbiota intestinal de truta arco-íris. Foi observado que as dietas suplementadas com 2,5% do produto promoveram ganho de peso significativo quando comparado com o grupo controle. Os resultados do crescimento médio diário e sobrevivência aumentaram com esta suplementação. Os autores reportaram que elevada população de bactérias ácido-láticas foram encontradas no intestino dos animais após doze semanas de tratamento.

Alizadeh et al. (2011) analisaram o efeito do produto probiótico Bioplus®B, composto por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, no desempenho e composição da carcaça de trutas. Os resultados demonstraram que houve uma significativa correlação entre o aumento do nível de probiótico na dieta e a taxa de crescimento e ganho de peso. Além disso, observaram que os animais tratados apresentaram maior relação proteína / gordura corporal, comparados ao grupo controle. Os autores atribuem esse aumento do valor proteico na carcaça à síntese de enzimas proteolíticas e lipolíticas pelos probióticos no trato gastrointestinal dos animais. Esta observação também pode ser devido ao aumento do catabolismo de gorduras verificado na presença de concentrações crescentes de microrganismos probióticos. Estes resultados permitem afirmar que a aplicação deste produto probiótico é uma alternativa para a produção de peixes com mais proteína e menos gordura.

Lactobacillus acidophilus foi avaliado por Faramarzi et al. (2011) visando verificar o seu efeito sobre o desempenho zootécnico da truta arco-íris. Os resultados demonstraram um efeito significativo no ganho de peso e na taxa de crescimento específico dos animais suplementados com a referida espécie probiótica, quando comparados ao grupo controle. Observou-se também que o índice de mortalidade foi maior do grupo que não recebeu a dieta suplementada com probiótico. Os autores atribuíram a estes resultados o aumento na taxa de crescimento associado à melhora na digestibilidade dos nutrientes.

O efeito do produto probiótico comercial *Protectin*, constituído por 2×10^9 células/g das espécies *Streptococcus faecium*, *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Aspergillus ourozai* e *Candida pentolopsy*, sobre o desempenho de trutas arco-íris foi estudado por Payam (2011). Os resultados revelaram que o uso de referido produto probiótico promoveu ganho de peso e aumentou a taxa de crescimento dos animais em relação ao grupo controle.

A sobrevivência e o crescimento das fases larvais de Linguado (*Psetta maxima*) foram avaliados por Dagá et al. (2012) sendo estudada duas formulações probióticas à base de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. Os animais tratados apresentaram crescimento e sobrevivência superiores quando comparado com o grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Vendrell et al.(2008), analisando trutas arco-íris desafiadas com o patógeno *Lactococcus garvieae*. O probiótico adiministrado, contendo *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*, reduziu o índice de mortalidade de 78% para 50% em média.

Giri et al. (2013) avaliaram o potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum*, sobre o crescimento, imunidade e resistência a doenças (desafio com *Aeromonas hydrophila*) na espécie *Labeo rohita*, com melhora nos três parâmetros analisados. O êxito no tratamento foi atribuído à modulação na imunidade, constatada pelo aumento nas concentrações de lisozimas e imunogloblinas séricas e atividade da via do complemento, o que colabora com melhor atividade fagocitária, proporcionando melhores índices de sobrevivência.

O efeito do produto simbiótico comercial *Biomin IMBO* sobre parâmetros sorológicos e eficiência alimentar de alevinos de trutas arco-íris foi avaliado por Mehrabi et al. (2012). Composto por *Enterococcus faecium* combinado a frutooligossacarídeos (FOS), na proporção de 1g/kg de ração. O produto revelou-se capaz de aumentar o ganho de peso diário e assim, o peso final, a taxa específica de crescimento, o fator de condição corporal, a eficiência na conversão alimentar e a taxa de sobrevivência, quando comparados ao grupo controle. Os resultados revelaram a existência de uma correlação entre a alimentação

suplementada com produto simbiótico com a considerável melhora da produção de alevinos.

2.3.5 Parâmetros Hematológicos X Probióticos

Hematologia é o estudo do sangue ou a soma dos conhecimentos sobre o sangue. Grande parte das informações consiste em medidas de valores dos parâmetros hematológicos em condições normais e anormais. A aplicação dos estudos hematológicos em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos. Informações sobre o estado do organismo são obtidas estudando-se o sangue por meio da fisiologia, bioquímica e outros métodos (RANZANI-PAIVA et al., 2013). A hematologia é útil no diagnóstico de processos anemiantes, relativos ao eritrograma. Já o leucograma, fornece informações sobre a resposta sistêmica a estímulos externos e internos, e são utilizadas no diagnóstico de processos infecciosos (MAHONEY; MCNULTY, 1992).

A parte líquida do sangue, o plasma, é composta por cerca de 92% de água e 8% de substâncias sólidas, entre as quais se encontram proteínas como a albumina, o fibrinogênio, imunoglobulinas, hormônios e enzimas, sais minerais como o sódio, potássio e ferro, além de metabólitos e nutrientes como a glicose, uréia, aminoácidos, colesterol, gorduras e gases respiratórios. Para usos analíticos, o plasma contém muitos biomarcadores que desempenham papel importante no diagnóstico clínico do estado funcional e de doenças (BRODNIEWICZ-PROBA, 1991).

Os parâmetros hematológicos de peixes são utilizados como indicadores de seu estado fisiológico e seu estudo tornou-se generalizado no controle das patologias e manipulação de estresse na piscicultura. Relata-se que a percentagem de volume de eritrócitos e a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue fornece uma pista sobre o estado de saúde dos peixes (SAMPATH et al., 1998).

De acordo com Buenaño (2010), trutas, *O. mykiss* juvenis e fêmeas apresentam os seguintes valores para hemograma: Leucócrito ($2,76 \pm 0,20 \times 10^3/\mu\text{L}$); nas porcentagens de $79,45 \pm 1,60$ (linfócitos pequenos), $11,30 \pm 1,04$ (linfócitos grandes), $6,65 \pm 1,04$ (monócitos), $1,50 \pm 0,37$ (neutrófilos), $1,10 \pm 0,34$ (heterófilos) e $0,10 \pm 0,07$ (macrófagos). Os valores para eritrograma são: Eritrócitos ($1,59 \pm 0,06 \times 10^6/\mu\text{L}$), Hematócrito ($56,40 \pm 1,22\%$), Hemoglobina ($10,35 \pm 0,24 \text{ g/dL}$), VCM ($364,11 \pm 14,49 \mu^3$), HCM ($66,67 \pm 2,50 \text{ pg}$), CHCM ($18,43 \pm 0,42\%$). A maciça presença de linfócitos sugere que a resposta imune é principalmente viral. Basófilos e eosinófilos não foram identificados no hemograma de trutas em diferentes estágios de maturidade (SILVEIRA et al., 2004; BUENAÑO, 2010).

Em peixes estressados, geralmente se observa alterações no hematócrito, concentração de hemoglobina e número de linfócitos, acompanhadas de hiperglicemia (URBINATI; CARNEIRO, 2001).

A resposta imune inespecífica pode ser estimulada por probióticos. Essa constatação foi feita pela administração oral da bactéria *Clostridium butyricum* para trutas arco-íris o que melhorou a resistência a vibriose piscícola por aumento da atividade fagocitária dos leucócitos (Sakai et al., 1999). Nikoskelainen et al. (2003) demonstraram que a administração de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) na quantidade de 10^5 UFC g^{-1} de ração, estimulou o *burst* respiratório em trutas arco-íris.

Uma cepa de *Carnobacterium* sp. isolada a partir do intestino de salmão do Atlântico, foi efetiva no controle de infecções causadas por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio ordalii*, e *Yersinia ruckeri* em alevinos de salmonídeos alimentados com $5 \times 10^7 \text{ células/g}^{-1}$, adicionados à dieta (Robertson et al., 2000).

Culturas de *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Carnobacterium* sp. e uma cepa de coco gram-positivo não identificado, foram demonstradas como benéficas para trutas quando estas cepas foram administradas como aditivo alimentar. Sua aplicação reduziu significativamente o impacto da furunculose por exclusão competitiva e melhora na imunidade mediada por células (IRIANTO; AUSTIN, 2002). Similarmente, uma cepa de *V. alginolyticus* na proporção $10^8 \text{ células ml}^{-1}$ foi aplicada em um tratamento de imersão para salmão do Atlântico.

Os experimentos revelaram que a aplicação do probiótico levou a uma redução na mortalidade após a exposição a *A. salmonicida*, e em menor extensão, após a exposição a *V. anguillarum* e *V. ordalii* (AUSTIN et al., 1998).

Irianto e Austin (2002) observaram que a alimentação composta de bactérias probióticas Gram positivas e Gram negativas em 10^7 células/g de ração levou a um aumento notável do número de eritrócitos após duas semanas de alimentação de trutas arco-íris. Além disso, ocorreu aumento de células brancas do sangue que contribuem para melhoria na resposta imune não-específica mediada por neutrófilos e macrófagos. As contagens relativas mais elevadas de células fagocíticas (neutrófilos e monócitos) e os linfócitos também são indicativos de infecção nos peixes (MAHONEY; MCNULTY, 1992). Probióticos interagem com as células do sistema imunológico, tais como as células mononucleares fagocíticas (monócitos e macrófagos) e leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células NK para melhorar as respostas imunitárias inatas (IRIANTO; AUSTIN, 2002; NIKOSKELAINEN et al, 2003;. KUMAR et al, 2008). Probióticos também estimulam ativamente a proliferação de linfócitos (tanto as células B e T) e ainda a produção de imunoglobulina em peixes (AL-DOHAIL et al, 2009; PICCHIETTI et al, 2009).

Dias (2010) avaliou a influência do probiótico composto de *Bacillus subtilis* na hematologia e migração de macrófagos do peixe conhecido como matrinxã (*Brycon amazonicus*) nas diferentes fases de desenvolvimento, incluindo reprodução, larva e engorda. Os resultados evidenciaram que as matrizes que receberam a dieta suplementada com probiótico apresentaram aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, o que indica melhora no sistema imune dos animais além de significativo aumento do número de ovócitos e, consequentemente, aumento nas taxas de fertilização e eclosão das larvas.

Lactobacillus acidophillus foi avaliado por Faramarzi et al. (2011) visando verificar o seu efeito sobre a resistência a doenças da truta arco-íris. Observaram que o índice de mortalidade foi maior do grupo que não recebeu a dieta suplementada com probiótico, além de se verificar aumento no número de células vermelhas e brancas no sangue e da concentração de hemoglobina com o aumento do nível de inclusão do probiótico na dieta dos animais. Os autores

atribuíram a estes resultados o aumento na taxa de crescimento associado à melhora na digestibilidade dos nutrientes.

2.3.6 Estresse no Ambiente de Produção X Probióticos

De acordo com Wendelaar Bonga(1997), o ambiente aquático é muito dinâmico e por isso, pode sofrer alterações rápidas ou extremas que geram estresse e comprometem a homeostase. Agentes estressores podem ser de natureza química (baixa taxa de O₂ dissolvido, presença elevada de amônia e nitrito, poluentes orgânicos ou inorgânicos); de natureza física (manuseio, alta densidade populacional, captura); além de estressores sazonais como os períodos de estiagem e interações biológicas.

A perda da homeostase é consequência da Síndrome de Adaptação Geral (SAG), que desencadeia respostas ao estresse em três níveis fisiológicos (STARNES et al., 1994). Estas respostas segundo Oba et al.(2009), são consideradas indicadores para avaliação do nível de estresse. A resposta primária ou neurofisiológica é a qual o organismo sente o estímulo estressante. É marcada pelo aumento dos hormônios corticosteroides e catecolamidas (cortisol, adrenalina e noradrenalina). Estes hormônios estimulam a hidrólise das reservas de glicogênio hepático, o que eleva a glicose sérica e os batimentos cardíacos, indicando a adaptação e resistência do organismo em presença o agente estressante. Como consequência se inicia a resposta secundária, caracterizada pelo aumento anômalo da permeabilidade celular (diapedese). Com a alteração do número de leucócitos, inicia-se a fase terciária, marcada pela diminuição do número de linfócitos e aumento de neutrófilos, o que leva a exaustão e perda da capacidade de adaptação e a baixa resistência dos peixes às doenças (MAZEAUD et al., 1997).

Segundo Oliveira e Cyrino (2003), os fatores estressantes têm sido a principal causa das perdas de lucros na piscicultura intensiva, pois afeta o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento dos peixes. A cessação da alimentação é uma das respostas mais evidentes dos peixes expostos a agentes estressores no ambiente de criação, que, somado aos efeitos catabólicos do

cortisol e das catecolamidas sobre as reservas energéticas, resulta em baixo crescimento, e com isso a perdas produtivas (OBA et al., 2009).

O hormônio cortisol é o indicador de estresse mais utilizado na criação de peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento (WEENDELAAR BONGA, 1997). Os níveis de corticosteróides em resposta ao estresse podem variar entre indivíduos e mesmo dentro da mesma espécie. Deste modo, em uma dada população, tanto pode haver animais que apresentem um nível consideravelmente elevado de cortisol, como os que respondem brandamente, em determinadas situações de estresse, ambos demonstrando desempenho similar (POTTINGER et al., 1992, PANKHURST; VAN DER KRAAK, 2000; WEIL et al., 2001). Segundo Oba et al. (2009), os valores basais de cortisol para salmonídeos se encontram em torno de 10 µg/mL.

A aplicação de probióticos tem sido eficaz para melhorar a tolerância de várias espécies de peixes a estressores ambientais, particularmente na fase larval (LARA-FLORES et al., 2003; TAOCA et al., 2006; ROLLO et al., 2006; RAJ et al., 2008).

Lara-Flores et al.(2003), avaliaram o efeito do uso de *Lactobacillus acidophillus* e *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de tilápia do Nilo sob desafio de estresse por aumento na densidade de estocagem. Os resultados indicam que os alevinos alimentados com dietas com um suplemento de probióticos apresentaram maior crescimento do que aqueles alimentados com a dieta controle e, que a levedura, é um aditivo estimulante de crescimento adequado no cultivo de tilápia.

Rollo et al. (2006) avaliaram o efeito de duas espécies de lactobacilos, *L. fructivorans* e *L. plantarum*, no desenvolvimento de pargo (*Sparus aurata*). Os animais foram submetidos ao estresse por meio da variação do pH (de 6,3 a 8,0) da água. Os resultados revelaram que a taxa de mortalidade foi significativamente menor nos grupos tratados com probiótico quando comparados ao grupo controle. Os autores relataram que houve melhora na tolerância ao estresse agudo dos alevinos de pargo tratados com probióticos e sugeriram que estes resultados se devem à redução da expressão de genes ligados à produção de cortisol.

O estresse provocado pelas condições de transporte pode ser diminuído pela aplicação de probióticos, como constatado por Raj et al.(2008). A água dos tanques de transporte, previamente tratada com 10 ppm de probióticos, melhorou a sobrevivência de alevinos de Carpa (*Catla catla*), quando comparado ao grupo não tratado. Além disso, a administração de probióticos por cinco dias após o transporte foi capaz de aumentar a taxa de crescimento.

Taoka et al. (2006) avaliaram o efeito do probiótico comercial Alchem-Poseidon, contendo *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre tolerância ao estresse e resposta imune inespecífica de linguado (*Paralichthys olivaceus*) acondicionado em um sistema com recirculação de água. Os grupos tratados apresentaram maior taxa de sobrevivência, o que foi atribuído a uma melhora nos parâmetros de qualidade da água. Os animais tratados também apresentaram melhor sobrevivência quando a temperatura foi elevada ou quando desafiados com o patógeno *Vibrio anguillarum*. Os resultados sugerem que o tratamento proporciona maior tolerância ao estresse e resistência a patógenos.

Peixes da espécie conhecida como pescada (*Dicentrarchus labrax* - European sea bass) foram submetidos a tratamentos com uma preparação probiótica contendo *L. delbrueckii* por Carnevali et al.(2006), sendo avaliados parâmetros de crescimento corporal e marcadores de estresse, como o cortisol. Foi detectado que os grupos tratados com probióticos apresentaram maiores índices de crescimento, com um nível menor de cortisol plasmático. Os autores correlacionaram a melhora no desempenho dos animais à menor expressão de genes que sintetizam fatores de inibição de crescimento (IGF-1), além de diminuir a concentração de miostatina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Estação Experimental de Salmonicultura “Ascânio Faria” da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), situada em Campos do Jordão-SP e no Laboratório de Probióticos da EEL-USP.

3.1 ANIMAIS

3.1.1 Acondicionamento dos peixes e aclimação

Foram utilizados exemplares de um ano de idade de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, provenientes de um lote de 100% fêmeas, com peso médio de $161,8 \pm 25,31$ g e comprimento de $24 \pm 1,16$ cm. O acondicionamento dos peixes foi feito em tanques de fibra de vidro com capacidade para 1500 litros, com sistema de renovação de água contínuo numa taxa de 2 renovações por hora, com uma densidade de estocagem de 15 kg/m^3 . O arraçoamento foi realizado duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h) com uma quantidade de ração equivalente a 1,5 % da biomassa por dia. O período de aclimação foi de 4 meses, durante o qual os animais receberam alimentação constituída de ração extrusada de 4 mm contendo 40% de proteína bruta.

3.1.2 Seleção e identificação dos animais

Após os quatro meses, os animais foram submetidos a uma pré-seleção por meio de biometria e exame macroscópico. Tal procedimento foi adotado para que não fosse incluído nas unidades experimentais algum exemplar de dimensões discrepantes dos demais, a fim de se evitar hierarquia durante a alimentação ou portadores de alguma deformidade. Dos animais admitidos, 140 foram devidamente identificados com “transponders” magnéticos (microchip) e acondicionados em quatro tanques. O arraçoamento durante o período de

triagem foi realizado conforme descrito no item 3.1.1, sendo alterado o diâmetro da ração para 6 mm para que se tornasse compatível ao tamanho dos animais.

3.1.3 Manejo dos tanques

Os tanques eram dotados de sistema de renovação de água constante correspondendo a uma taxa de duas renovações por hora, com água proveniente de manancial da região do Horto Florestal de Campos do Jordão, sendo previamente separada de sedimentos e partículas suspensas. Os tanques e tubulações foram higienizados por meio de escovação a cada quinze dias, evitando o acúmulo de matéria orgânica, visando manter a qualidade da água. Os peixes foram mantidos na densidade de estocagem de 15 kg/m³, durante o experimento. No entanto, 2 dos 4 grupos foram submetidos a uma situação de estresse crônico de manejo por meio do aumento temporário da densidade de estocagem. A qualidade da água de abastecimento e da saída para os tanques, foi monitorada a cada 4 dias por meio da determinação da temperatura e da oxigenação.

3.1.4 Indução de estresse

Para a indução estresse crônico de densidade, buscou-se uma metodologia que pudesse ser aplicada de forma homogênea entre os grupos e que fosse reprodutível. Assim, buscou-se um método que evitasse o surgimento de variáveis não contempladas (tempo de aplicação do estresse, manejo de cada aplicador, ordem e período da aplicação do método de estresse) de alguns procedimentos, que usam simulações de transporte, perseguição com redes de captura, variações de parâmetros físico-químicos da água e competição social interespecífica. Foi considerado também que outras técnicas de adensamento populacional (diminuição da densidade por limitação do espaço disponível nos tanques ou realocação dos animais em tanques menores) não atendem as boas

práticas de manejo preconizadas em piscicultura por interferirem na alimentação dos animais.

Desta forma, o estresse dos animais foi induzido por meio da redução do nível normal de água nos tanques uma vez por dia, com duração de 90 minutos a partir das 12 horas. Para tanto utilizou-se de um mecanismo de bomba submersa adaptado no tubo de nível da água, que atuou aumentando a vazão de saída, e assim reduzindo o nível de água dos tanques. A vazão de entrada de água ajustada para aproximadamente 1000 L/h foi compensada pela bomba com vazão de 2000 L/h, sendo posicionada de forma que a densidade do tanque fosse alterada para 45 kg/m³. O acionamento do mecanismo foi controlado por meio de *timer* digital, acoplado a um aparelho *no-break*, a fim de evitar quedas no fornecimento de energia.

O volume do tanque em função da biomassa foi calculado empregando-se fórmula $V = \frac{1}{3} \pi h(R^2 + Rr + r^2)$, onde V= volume; h= altura do tanque; R= raio superior; raio inferior. Consideradas as dimensões dos tanques, no formato de tronco de cone, correspondendo a 1530 mm de diâmetro inferior, 1830 mm de diâmetro superior e a altura de 905 mm, calculou-se o raio inferior e superior e de posse desses valores, estimou-se altura da coluna de água necessária para atingir os volumes desejados.

Figura 2 – A. Tanques utilizados no experimento; B. Dispositivo utilizado para regular a vazão de saída dos tanques.

Fonte: do autor

3.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

No presente trabalho foram avaliadas quatro cepas de *Lactobacillus*, na forma de um “pool”, constituído por *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. casei* ATCC 7469, adquiridas da coleção de culturas da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia, Campinas/SP.

As respectivas cepas foram individualmente mantidas, a 4 °C, em ágar MRS composto por: peptona (10g/L), extrato de carne (8g/L), extrato de levedura (4g/L), glicose (20 g/L), fosfato dipotássio (2g/L), acetato de sódio trihidratado (5g/L), citrato triamoniaco (2g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2g/L), sulfato de manganês (0,05g/L), ágar (15g/L) e Tween 80 (1ml/L). A contagem de células foi realizada indiretamente por leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm, sendo o resultado obtido por meio de uma curva de calibração (DO x UFC/mL). A confirmação da identidade das culturas foi realizada periodicamente por coloração de Gram, teste de catalase e plaqueamento pelo método *pour plate* (COUTINHO, 2012).

3.3 PREPARO DO “POOL” DE *LACTOBACILLUS*

Para a formulação da preparação probiótica constituída do “pool” de *Lactobacillus*, as respectivas cepas foram reativadas individualmente por meio de repiques sucessivos em tubos de centrífuga com capacidade de 1litro (Beckman J6-HC) contendo 600 mL de caldo MRS, pH 6,2, esterilizado a 121 °C por 20 min, e incubadas a 37 °C por 48h. As suspensões de células obtidas foram centrifugadas ($4,7845 \times g$ / 30 minutos; Figura 2-A), os sobrenadantes descartados por sucção (Figura 2-B) e as células ressuspensas em 10 mL de solução fisiológica seguido de homogeneização com auxílio de vórtex (Figura 2-C). As suspensões resultantes foram devidamente caracterizadas quando ao número de células e alíquotas de cada suspensão, contendo o mesmo número de células, foram juntadas para se conseguir o “pool” de *Lactobacillus* contendo 4×10^{10} UFC/mL.

Figura 3 – Preparo do “pool” de *Lactobacillus*. A. Etapa de centrifugação; B. Descarte do sobrenadante; C. Ressuspensão e homogeneização de células em vórtex.

Fonte: do autor

3.4 INCORPORAÇÃO DA PREPARAÇÃO PROBIÓTICA NA RAÇÃO

Este procedimento foi conduzido em conformidade com o descrito por Gonçalves (2009), com algumas modificações. Para tanto se utilizou ração comercial extrusada específica para peixes carnívoros, com granulação de 6 mm, adequada ao tamanho dos animais. Desta forma, cada quilograma de ração recebeu 10 mL do “pool” contendo 4×10^{10} UFC/ml utilizando-se como veículo óleo de soja na proporção de 2% da massa da ração. Esta técnica garantiu a aderência das células ao grão de ração evitando sua dispersão na água. A preparação probiótica foi ressuspensa em óleo de soja e incorporada à ração com auxílio de misturador circular (Figura 3).

Figura 4 – Incorporação da preparação probiótica na ração. A- Suspensão de células; B- Inoculação da suspensão na ração sob rotação; C- Misturador circular.

Fonte: do autor

Os animais do grupo controle receberam ração onde o “pool” de *Lactobacillus* foi substituído por mesmo volume de solução fisiológica. As rações assim preparadas foram acondicionadas em sacos plásticos em quantidades suficientes para o uso diário, que correspondeu a 1,5% da biomassa de cada tanque. Esse procedimento foi realizado a cada trinta dias, sendo as rações mantidas refrigeradas a 4°C.

A viabilidade das células das respectivas cepas probióticas, contidas na ração devidamente armazenada, foi avaliada de acordo com Corrêa-Junior et al. (2009), após 7, 15, 30, 45, 60 e 120 dias do preparo. Para tanto, uma porção representativa da ração foi diluída em solução salina a 0,9% esterilizada na proporção de 1 g de ração para 9 mL de solução salina. Após homogeneização em vórtex por 5 minutos, foram preparadas diluições seriadas para plaqueamento pelo método de *pour plate* em ágar MRS. As placas em triplicata foram incubadas por 2 dias a 37°C para posterior contagem de colônias (UFC/g ração).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente trabalho os efeitos da referida preparação probiótica foram avaliados utilizando-se 140 animais, com peso médio de $360,8 \pm 22,67$ g e comprimento de $30,2 \pm 0,8$ cm distribuídos em quatro tanques, sendo 35 peixes em cada, durante um período de 60 dias. O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 , sendo duas dietas (ração controle e ração com probióticos) e duas condições de manejo (manejo normal e manejo em condições de estresse) conforme descrito abaixo:

Grupo NR – grupo controle – os animais receberam apenas ração

Grupo ER – grupo estresse de manejo e ração.

Grupo NP – grupo suplementado com a preparação probiótica.

Grupo EP – grupo estresse e suplementação com a preparação probiótica.

Os animais dos grupos ER e EP foram submetidos a condições de estresse crônico de manejo conforme descrito no item 3.1.4. Oito indivíduos de cada grupo foram amostrados para a biometria e coleta de sangue e tecidos após 30 e 60 dias.

3.6 BIOMETRIA, COLETA DE SANGUE E TECIDOS

A alimentação foi interrompida no dia anterior à coleta visando submeter os animais a 24 horas de jejum. Os animais foram coletados com auxílio de um puçá e imersos em solução de benzocaína (100 mg/L) imediatamente após a captura. Durante sua contenção, os animais foram mantidos com pano úmido sobre os olhos. Após a constatação do estado letárgico e identificação dos microchips (Figura 4-A), os animais foram pesados e medidos.

Para a coleta de sangue foi utilizado seringas e agulhas descartáveis de 5 mL, com punção realizada a partir dos vasos caudais (Figura 4-D). Cerca de 2,5 mL do sangue colhido foi centrifugado a 1300 x g por 25 minutos para a separação do soro em tubos de ensaio com gel separador de hemácias. O soro retirado foi acondicionado em tubos eppendorf e congelado a -80°C. Uma alíquota do sangue total foi utilizada para as análises hematológicas. Para tanto, 2 mL das amostras do sangue colhido foram transferidas para tubos contendo anticoagulante EDTA e refrigeradas a 6°C (ISHIKAWA et al., 2010).

Em seguida os animais foram eutanaziados por aprofundamento do estado anestésico em solução de benzocaína (100 mg/L) para a retirada das vísceras e aferição da massa de suas respectivas carcaças. Amostras de fígado e músculo foram coletadas com uso de instrumental cirúrgico, acondicionadas em tubos eppendorf e congeladas a -80°C. Porções finais e iniciais dos intestinos, cecos pilóricos foram coletados com auxílio de tesoura cirúrgica, acondicionados em tubos falcon contendo 3 mL de fixador Carnoy, e após 12 horas substituiu-se por álcool 70%.

Amostras de fezes foram recolhidas diretamente da porção final do intestino grosso, acondicionadas em tubos eppendorf e congeladas a -80°C, para posterior análise.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Determinação do Comprimento e do Peso dos Animais

Os animais tiveram seu comprimento total (distância entre a ponta do focinho e o maior raio caudal) e padrão (distância entre a ponta do focinho e o final do pedúnculo caudal) determinados com auxílio de um “ictiômetro”. Estas medidas foram feitas, por convenção, sobre o lado esquerdo do animal, sendo o peixe deitado sobre o seu lado direito, com a cabeça voltada para a esquerda, com a boca fechada e o focinho encostado à antepara do ictiômetro, conforme mostrado na Figura 4-C (FAO, 1974).

Figura 5 - A- Identificação; B- Pesagem; C- Biometria; D- coleta sanguínea.

Fonte: do autor

A massa dos animais vivos bem como suas vísceras e carcaças, foi determinado por meio de uma balança eletrônica (Figura 4-B) com capacidade máxima de 1 kg e precisão de 0,1 g (FAO, 1974). A biomassa restante nos tanques foi aferida após a retirada dos 8 animais. Para tanto os animais restantes

nos tanques foram coletados com auxílio de puçá e transferidos para caixas vasadas onde puderam ser contados e pesados por meio de balança analítica. A massa média dos animais foi calculada pela soma das massas dos animais coletados e os restantes no tanque e dividida pelo número total de animais.

3.7.2 Determinação dos parâmetros hematológicos

As amostras de sangue total foram analisadas de acordo com os métodos de rotina adaptados à hematologia de peixes (BLAXHALL; DAISLEY, 1973; HAGHIGHI, 2010; RANZANI-PAIVA et al, 2013).

A contagem global de hemácias ($\text{HEM} \times 10^6/\mu\text{l}$) foi determinada por meio de câmara de Neubauer empregando solução de Hayem como diluente.

O hematócrito foi determinada em duplicata por meio de centrifugação em tubos microcapilares, preenchidos em 75% do volume e vedados com massa de modelar em uma de suas extremidades. Após a vedação, os capilares foram levados à centrífuga de micro-hematócrito e submetidos à centrifugação a 15.000 x g por 5 min. Para a leitura foi utilizado tabela própria para este método (GOLDENFARB et al., 1971).

A concentração de hemoglobina (g/dL) foi determinada por espectrometria em duplicata pelo método da cianometahemoglobina, usando líquido de Drabkin (DRABKIN, 1945).

Os índices hematimétricos, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM pg), a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM %), e o Volume Corpuscular Médio (VCM fL) foram calculados em conformidade com a metodologia descrita por Wintrobe (1934).

A contagem total de leucócitos foi determinada por método indireto através da contagem de 2000 células na extensão sanguínea (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos). Dentre estas, foram marcados quantas eram leucócitos. Através de regra de três, considerando o número total de eritrócitos contados na

Câmara de Neubauer, calculou-se o número total de leucócitos ($\text{LEU} \times 10^3/\mu\text{L}$), conforme a equação:

$$\text{valor absoluto de leucócitos} = \text{leucócitos contados} \times n^{\circ} \text{ total de células}/2000$$

A proporção entre as distintas variedades de leucócitos (contagem diferencial de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos) foi determinada com base em seus caracteres de identificação de acordo com Ranzani-Paiva et al. (2013). Para tanto foram confeccionadas 3 extensões sanguíneas preparadas sobre lâmina de microscopia, coradas pelo método panótipo. O número percentual de células brancas foi calculado pela média de 3 contagens de 100 células, com auxílio de contador diferencial digital.

3.7.3 Determinação dos níveis de cortisol e glicose

O hormônio cortisol é o mais importante marcador de estresse em peixes. Os níveis de cortisol foram determinados pela técnica de ELISA (EIA), utilizando-se o kit DBC (Diagnostics Biochem Canadá, Inc.). O teste de EIA consiste na reação do antígeno presente na amostra com uma enzima marcada com um antígeno conjugado e a anticorpos vinculados aos poços da microplaca. Deste modo, 20 μL do soro foram transferidos em duplicata para poços da microplaca e, em seguida, 100 μL do conjugado utilizando uma pipeta multicanal. A placa foi incubada à temperatura ambiente em agitador automático (Tecnal-TE420) a 200 rpm por 45 minutos. Os poços foram lavados com auxílio de uma lavadora de microplacas e então 150 μL do substrato foram pipetados em cada poço, seguido por incubação da microplaca em agitador. Após 20 minutos foram adicionados 50 μL de solução 1 M de ácido sulfúrico para bloquear a reação, seguido pela leitura da microplaca utilizando filtro de 450nm. As médias das leituras de densidade ótica foram plotadas em uma curva padrão composta por 8 calibradores, a partir da qual o cortisol presente nas amostras e controles pode ser aferido diretamente ou calculado pelo software da leitora de microplacas (Termo Plate-TP Reader MN).

A glicemia é utilizada como indicador bioquímico de distúrbios do metabolismo de carboidratos associados ao estresse. Esta foi avaliada pelo método da glicose oxidase, que tem como princípio a reação da enzima glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose existente na amostra, em presença de oxigênio, produzindo peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a reação do fenol pelo peróxido de hidrogênio formado em presença de 4-aminoantipirina produzindo um composto de cor rosa (quinonimina), medido por espectrometria a 505 nm, A intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. No presente trabalho se utilizou kit comercial de glicose da marca BIOTÉCNICA. Os testes foram feitos em duplicata, para tanto foram utilizados 10 µl de soro para 1 ml de reagente, incubados em tubos de ensaio de 5 ml em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. As reações foram lidas imediatamente após a incubação em espectrofotômetro (Thermo Scientific - BIOMATE 3S). A média da leitura de densidade ótica de cada amostra em duplicata foram plotadas em uma curva padrão composta por 6 calibradores, a partir da qual a glicose presente na amostra e nos controles pode ser aferida diretamente ou calculada pelo software do espectrofotômetro.

3.7.4 Determinação do nível de oxigenação e temperatura média da água

O nível de oxigênio da água foi determinado por meio de oxímetro (YSI/F-1550) e a temperatura foi determinada com auxílio de termômetro de máxima e mínima.

3.7.5 Desempenho Zootécnico

O desempenho zootécnico dos animais foi avaliado de acordo com a metodologia descrita pela FAO (1974), considerando os dados biométricos, submetidos aos seguintes cálculos:

Taxa de crescimento específico

$$\text{Taxa de Crescimento Específico (\%)} = \frac{[Massa\ final - Massa\ inicial\ (kg)]}{[Tempo\ (dias)]} \times 100$$

Fator de condição corporal

$$\text{Fator de Condição Corporal (g/cm)} = \frac{[Massa\ final - Massa\ inicial\ (g)]}{[Comprimento\ final\ (cm)]}$$

Índice viscerossomático

$$\text{Índice Viscerosomático (\%)} = \frac{[Massa\ das\ vísceras\ (g)]}{[Massa\ corpórea\ (g)]} \times 100$$

Rendimento da carcaça

$$\text{Rendimento da Carcaça (\%)} = \frac{[Massa\ da\ carcaça\ (g)]}{[Massa\ corpórea\ (g)]} \times 100$$

3.8 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos e da qualidade da água nos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelos testes de Tukey e Kruskal-Wallis para constatar diferenças entre os tratamentos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média e foram considerados como significativos quando $p < 0.05$. Os cálculos e a análise estatística foram realizados com auxílio do software Action, complemento do software Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA

Os resultados referentes ao nível de oxigênio dissolvido na água utilizada para alimentação dos tanques encontram-se apresentados na Tabela 1. Observou-se que durante o experimento não foram verificadas alterações expressivas nos valores da temperatura média da água ($15^{\circ}\text{C} \pm 1,5$), assim como a concentração de oxigênio dissolvido ($7,36 \text{ mg/L} \pm 0,38$), permanecendo dentro dos limites aceitáveis para a truticultura. De acordo com Tabata (2013), a temperatura ideal para a criação de trutas deve estar entre 15 e 17°C , e a concentração de oxigênio dissolvido deve ser superior a 5 mg/L . Os resultados observados no presente trabalho demonstraram que a manutenção da qualidade da água foi garantida pela renovação constante de água e limpeza periódica dos tanques.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão referentes aos níveis de oxigênio dissolvido na entrada e saída de cada tanque durante o experimento com truta *Oncorhynchus mykiss*, alimentadas com dieta contendo probiótico e submetidos a estresse de manejo.

Grupos	Oxigênio - entrada (mg/L)	Oxigênio - saída (mg/L)	Oxigênio - consumido (mg/L)
NR	$7,36 \pm 0,38$	$4,90 \pm 0,42$	$2,46 \pm 0,40$
NP		$4,85 \pm 0,52$	$2,58 \pm 0,37$
ER		$4,78 \pm 0,42$	$2,51 \pm 0,34$
EP		$4,77 \pm 0,51$	$2,59 \pm 0,35$

Grupo NR – grupo controle – os animais receberam apenas ração; Grupo ER – grupo estresse de manejo e ração; Grupo NP – grupo suplementado com a preparação probiótica; Grupo EP – grupo estresse e suplementação com a preparação probiótica.

As médias apresentadas não diferem significativamente segundo o teste Tukey $p > 0,05$.

4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS PROBIÓTICOS NA RAÇÃO

A variação da população das cepas de *Lactobacillus* incorporadas na ração encontra-se demonstrada na Figura 5. Verifica-se uma redução na população de células correspondente a 2% após 30 dias de armazenamento, sendo observada, após esse período, uma população equivalente a $3,48 \times 10^8$ UFC/g, o que atende satisfatoriamente a um dos critérios que caracterizam uma boa preparação probiótica.

Figura 6 - Variação da população das cepas probióticas incorporadas na ração

Fonte: do autor

Segundo Saad (2006), a dose diária para se observar o valor terapêutico de uma preparação probiótica equivale a 10^6 a 10^9 UFC/g. Para Merrifield et al. (2010) mais estudos com probióticos em salmonídeos são necessários para se estabelecer valores de referência para estas aplicações, uma vez que níveis apropriados podem variar de acordo com a espécie de microrganismo probiótico, espécie e estado de saúde do peixe hospedeiro. Além disso, é necessário que se estabeleça dosagens de produtos para objetivos específicos, como promoção de saúde, resistência às doenças e nutrição.

Nota-se que, após 120 dias de armazenamento da ração contendo a preparação probiótica, foi possível verificar um valor médio de $2,80 \times 10^8$ UFC/g, demonstrando que durante esse período houve decréscimo de $1,09 \times 10^8$ UFC/g,

o que corresponde a 28%, não sendo observadas reduções significativas ($p>0.05$) nas populações de *Lactobacillus* ao longo do tratamento.

Estes resultados permitem constatar a eficácia da incorporação das cepas probióticas na ração utilizando-se óleo de soja como veículo. Verifica-se ainda que a população de células viáveis mantidas na ração é compatível com os valores reportados por Corrêa-Junior et al. (2009), que demonstraram que o óleo de soja é eficaz como veículo para a incorporação, em nível artesanal, de cepas probióticas à ração de peixes garantindo uma boa viabilidade.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DAS TRUTAS

Os resultados referentes ao desempenho zootécnico dos animais submetidos a diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 2. Ressalta-se que pela biometria realizada no primeiro dia do experimento, ficou demonstrado que os grupos foram distribuídos adequadamente apresentando-se homogêneos ao nível de 99% de significância.

Acrescenta-se que não ocorreu mortalidade bem como o surgimento de enfermidades que pudessem interferir negativamente no desempenho dos animais. Também não foi verificado sobras de ração a uma taxa de arraçoamento de 1,5% da biomassa. Desta forma, estes resultados permitem verificar que a suplementação das respectivas dietas com as cepas probióticas é segura, não afetou a palatabilidade da ração extrusada e não influenciou negativamente no apetite dos animais.

No tocante aos demais parâmetros zootécnicos avaliados, observou-se que não houve diferenças significativas ($p>0.05$) entre os tratamentos estudados, visto que os valores médios de comprimento e massa (da carcaça, das vísceras e total), evoluíram de forma constante entre os grupos ao longo dos 60 dias de tratamento.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão dos resultados biométricos e desempenho zootécnico em experimento com truta *Oncorhynchus mykiss*, alimentadas com dieta contendo probiótico e submetidos a estresse de manejo.

DIA	Grupos	Massa (g)	Comprimento (cm)	Fator de Condição Corporal (g/cm)	Massa das Visceras (g)	Rendimento da Carcaça (%)	Índice Viscerossomático (%)	Taxa de Crescimento Específico (%)*
inicial	NR	406,3 ± 26,7	27,0 ± 0,95					
	NP	405,5 ± 31,5	26,9 ± 0,89	15,1 ± 1,00	57,40 ± 6,26	85,60 ± 0,94	14,50 ± 0,94	31,00 ± 8,35
	ER	404,8 ± 24,4	27,0 ± 0,75					
	EP	400,4 ± 25,7	26,8 ± 1,00					
30	NR	521,6 ± 19,8	30,5 ± 0,46	17,3 ± 1,15	74,70 ± 9,76	86,50 ± 0,90	13,50 ± 0,90	37,70 ± 4,10
	NP	522,2 ± 15,5	30,0 ± 0,85	17,1 ± 0,94	66,90 ± 7,38	87,30 ± 0,80	12,70 ± 0,80	33,80 ± 7,00
	ER	505,5 ± 21,7	30,1 ± 0,65	16,3 ± 0,48	69,20 ± 10,63	86,40 ± 1,29	13,60 ± 1,29	30,90 ± 5,20
	EP	500,7 ± 19,1	29,5 ± 1,06	17,6 ± 0,93	67,60 ± 15,74	85,90 ± 2,53	14,10 ± 2,53	35,60 ± 5,41
60	NR	645,2 ± 36,5	31,4 ± 0,85	19,3 ± 0,84	83,40 ± 8,19	86,30 ± 1,40	13,70 ± 1,40	32,00 ± 5,00
	NP	659,0 ± 30,1	31,9 ± 0,70	19,5 ± 1,26	83,50 ± 7,15	86,70 ± 1,20	13,30 ± 1,20	37,90 ± 8,00
	ER	621,7 ± 43,7	31,7 ± 1,09	18,7 ± 2,17	78,80 ± 12,31	87,50 ± 2,41	12,50 ± 2,41	32,10 ± 9,40
	EP	619,9 ± 38,1	31,5 ± 1,19	19,0 ± 1,36	82,10 ± 11,78	86,30 ± 1,68	13,70 ± 1,68	32,00 ± 6,60

Grupo NR – grupo controle – os animais receberam apenas ração; Grupo ER – grupo estresse de manejo e ração; Grupo NP – grupo suplementado com a preparação probiótica; Grupo EP – grupo estresse e suplementação com a preparação probiótica.

* Taxa de crescimento específico com base nos 30 dias anteriores ao experimento.

As médias apresentadas não diferem significativamente entre si segundo o teste Tukey $p > 0.05$.

Consequentemente, os parâmetros calculados a partir desses dados biométricos (Fator de Condição Corporal, Rendimento de Carcaça, Índice Viscerosomático e Taxa de Crescimento Específico) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0.05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Meurer et al.(2006), os quais não verificaram variações significativas quanto aos parâmetros zootécnicos em tilápias alimentadas com ração suplementada com *Saccharomyces cerevisiae*. O mesmo foi reportado por Nakandakare (2010), que alimentou tilápias com o protuto probiótico PAS TR[®], composto por Cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi*.

Em contrapartida, resultados opostos foram reportados na literatura no tocante ao o efeito de diferentes preparações probióticas sobre o desempenho zootécnico da truta arco-íris (BAGHERI et al., 2008; VENDRELL et al., 2008; MERRIFIELD et al., 2010; AZARI et al., 2011; ALIZADEH et al., 2011; FARAMARZI et al., 2011; PAYAM , 2011; GIRI et al., 2012; MEHRABI et al., 2012), assim como em ensaios realizados com outras espécies como tambaqui (GONÇALVES, 2009), matrinxã (DIAS, 2010), linguado (DAGÁ et al., 2012) e *Labeo rohita* (GIRI et al., 2013). Os diferentes resultados obtidos nestes trabalhos se devem provavelmente às condições experimentais, bem como a composição das preparações probióticas avaliadas. Nestes estudos foram avaliados produtos comerciais compostos de espécies dos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, todos com propriedades probióticas evidenciadas em peixes.

Ainda que não tenha sido observado favorecimento no perfil zootécnico dos grupos tratados, foi verificado efeito positivo sobre a taxa de crescimento específica (TCE) dos animais do grupo tratado com probiótico e não submetido a estresse de manejo (NP). A TCE consiste no incremento da massa corpórea em um determinado período de tempo (item 3.7.5.1). Neste tratamento, os animais apresentaram, ao final de 60 dias de experimento, valores de TCE cerca de 15% maior que os animais do grupo controle, no entanto, não diferindo estaticamente entre si ($p>0.05$).

De acordo com Merrifield et al. (2010), os benefícios conferidos por preparações probióticas dependem de uma série de fatores, como as espécies de microrganismos utilizadas, a forma de veiculação, ao delineamento experimental e a espécie de animal submetido ao tratamento. Conforme foi evidenciado no grupo cujos animais foram tratados com probiótico (NP) verificou-se efeito positivo sobre a taxa de crescimento específica após 60 dias. Esses resultados sugerem que a suplementação com probióticos deveria ocorrer por um período de tratamento mais longo para provocar alterações significativas no perfil zootécnico dos animais.

Desta forma, pode-se afirmar que o “*pool*” de espécies do gênero *Lactobacillus*, avaliado no presente trabalho, não favoreceu significativamente o desempenho zootécnico dos animais tratados nas condições experimentais estudadas.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O ERITROGRAMA DAS TRUTAS

Avaliações dos parâmetros relativos ao eritrograma são úteis no diagnóstico de processos anemiantes, assim como são importantes marcadores para a avaliação dos níveis de estresse.

Os resultados referentes ao eritrograma dos animais submetidos aos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 3.

No que se refere à contagem global de eritrócitos, foi observado diferenças significativas ($p < 0.05$) nos valores médios determinados após 30 dias de experimento no grupo cujos animais foram tratados com a preparação probiótica e submetidos ao estresse de manejo (EP). Este resultado foi significativamente superior aos valores observados no dia inicial, assim como em relação ao grupo controle (ER), o que sugere que houve neste tratamento um aumento no número de eritrócitos em resposta ao tratamento com probióticos. No entanto, após 60 dias de experimento não foram observadas diferenças entre os valores médios das contagens de eritrócitos.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos de truta *Oncorhynchus mykiss*, alimentadas com dieta contendo probiótico e submetidos a estresse de manejo.

DIA	Grupos	Eritrócitos (μ L)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
30	inicial	1,04 $\pm$ 0,13 ^a	49,7 $\pm$ 2,39 ^a	8,90 $\pm$ 0,61 ^a	494,5 $\pm$ 68,5 ^a	87,7 $\pm$ 10,0 ^a	17,8 $\pm$ 1,46 ^a
	NR	1,20 $\pm$ 0,21 ^a	51,2 $\pm$ 3,44 ^a	9,90 $\pm$ 0,64 ^b	439,5 $\pm$ 60,9 ^a	85,0 $\pm$ 11,5 ^a	19,4 $\pm$ 1,29 ^a
	NP	1,20 $\pm$ 0,16 ^a	52,6 $\pm$ 9,90 ^a	9,90 $\pm$ 0,86 ^b	457,4 $\pm$ 62,4 ^a	88,6 $\pm$ 13,4 ^a	19,2 $\pm$ 0,94 ^a
	ER	1,10 $\pm$ 0,13 ^a	55,6 $\pm$ 4,25 ^b	10,70 $\pm$ 0,86 ^b	504,3 $\pm$ 61,4 ^a	98,6 $\pm$ 6,9 ^b	19,6 $\pm$ 1,54 ^{ab}
	EP	1,30 $\pm$ 0,13 ^b	51,3 $\pm$ 4,21 ^{ab}	10,20 $\pm$ 0,87 ^b	406,7 $\pm$ 53,9 ^b	82,4 $\pm$ 9,0 ^{ab}	20,3 $\pm$ 0,99 ^b
60	inicial	1,04 $\pm$ 0,13 ^a	49,7 $\pm$ 2,39 ^a	8,90 $\pm$ 0,61 ^a	494,5 $\pm$ 68,5 ^a	87,7 $\pm$ 10,0 ^a	17,8 $\pm$ 1,46 ^a
	NR	1,00 $\pm$ 0,16 ^a	54,8 $\pm$ 3,72 ^{ab}	10,40 $\pm$ 0,97 ^b	567,6 $\pm$ 98,8 ^a	107,2 $\pm$ 20,4 ^b	19,1 $\pm$ 1,16 ^a
	NP	1,10 $\pm$ 0,16 ^a	55,1 $\pm$ 5,32 ^b	9,80 $\pm$ 0,77 ^{ab}	529,0 $\pm$ 105 ^a	94,6 $\pm$ 16,2 ^{ab}	17,8 $\pm$ 0,88 ^a
	ER	1,00 $\pm$ 0,17 ^a	53,7 $\pm$ 4,24 ^{ab}	10,00 $\pm$ 0,57 ^b	523,1 $\pm$ 77,5 ^a	96,2 $\pm$ 11,2 ^a	18,6 $\pm$ 1,18 ^a
	EP	1,10 $\pm$ 0,21 ^a	55,2 $\pm$ 3,93 ^b	9,80 $\pm$ 0,90 ^{ab}	517,8 $\pm$ 94,2 ^a	91,9 $\pm$ 19,8 ^a	17,7 $\pm$ 0,69 ^a

Grupo NR – grupo controle – os animais receberam apenas ração; Grupo ER – grupo estresse de manejo e ração; Grupo NP – grupo suplementado com a preparação probiótica; Grupo EP – grupo estresse e suplementação com a preparação probiótica.

VCM = Volume Corpuscular médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM= concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Médias comparadas entre o dia inicial e 30; inicial e 60.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente segundo o teste Tukey (p>0.05).

No que se refere ao percentual de hematócrito, observa-se que o grupo submetido ao estresse de manejo (ER) apresentou valores médios significativamente superiores ($p < 0.05$) após 30 dias de tratamento quando comparado ao dia inicial, o que demonstra o hematócrito acompanhou o aumento do número de eritrócitos. Entretanto, os valores de hematócrito do grupo ER, não diferiram estatisticamente do grupo tratado com probiótico (EP). Os animais dos grupos NP e EP apresentaram aumento dos valores médios de hematócrito após 60 dias de tratamento, sendo significativo ($p < 0.05$) quando comparados aos valores obtidos no dia inicial.

No tocante aos valores da concentração de hemoglobina, foi constatado que os animais de todos os grupos apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0.05$) em relação ao dia inicial, contudo, permaneceram estatisticamente inalterados entre si após 30 e 60 dias.

Os resultados encontrados para o eritrograma de trutas no presente experimento são semelhantes aos reportados por Faramarzi et al. (2011), que suplementaram a alimentação de trutas com *Lactobacillus acidophillus* por 30 dias, e a Irianto e Austin (2002), que suplementaram a alimentação de trutas com *Aeromonas hidrofila*, *Vibrio fluvialis* e *Carnobacterium sp.* por 14 dias.

De acordo com Oba et al. (2009) as alterações hematológicas referentes aos valores de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina são características da resposta secundária ao estresse, que é assinalada pelo aumento anômalo da permeabilidade celular. Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), podem indicar hemoconcentração ou hemodiluição: na hemoconcentração pode ser pela liberação de eritrócitos pelo baço; na hemodiluição a redução nos valores do hematócrito, ambas podendo ser causadas por distúrbios na regulação osmótica no sangue dos animais. Tais distúrbios são observados em resposta a estímulos estressores que desencadeiam a síndrome de adaptação geral, que, de acordo com Staurnes et al. (1994), também provocam alterações no comportamento dos animais.

Segundo Oliveira e Cyrino (2003) a alteração no eritrograma, de animais submetidos à estresse, decorre principalmente da adaptação do organismo na

tentativa de suprir o aumento da demanda energética, aumentando a capacidade de captar o oxigênio pelo sangue.

A contagem superior de eritrócitos após 30 dias de experimento nos animais que receberam a preparação probiótica sugere que as cepas probióticas atuam diminuindo o tempo de resposta do organismo, liberando mais eritrócitos na circulação e, conseqüentemente, melhorando a captação de oxigênio e assim à adaptação do organismo diante um estímulo extressor.

Os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) podem variar de acordo com os níveis de hemoglobina, hematócrito e de eritrócitos. Alterações nesses índices podem ser indicativas de processos anemiantes e podem ser provocadas por agentes estressores como manejo, transporte e densidade de estocagem, mas também podem revelar estado de carência nutricional. No presente estudo, os resultados dos índices hematimétricos apresentaram alterações significativas ($p < 0.05$). As variações observadas nos valores de VCM, HCM e CHCM estão de acordo com os resultados encontrados por Buenaño (2010) e não indicam condições fisiológicas anômalas, desnutrição dos animais ou estados anemiantes, uma vez que ficou demonstrado que houve incremento dos parâmetros biométricos ao longo dos tratamentos. As oscilações observadas nos índices hematimétricos após 30 dias de experimento não persistiram após 60 dias, o que, de acordo com Oliveira e Cyrino (2003), é indicativo de adaptação dos animais em resposta à dieta e ao estresse.

As alterações dos índices hematológicos dos peixes submetidos ao estresse revelou que a metodologia aplicada foi efetiva para induzir o estresse nos grupos estudados. Com esta metodologia buscou-se descartar a influência de variáveis³ não contempladas em alguns procedimentos descritos na literatura para indução de estresse, uma vez que o mecanismo utilizado para reduzir o nível de água dos tanques era dotado de acionamento automático. Foi considerado

³ (tempo de aplicação, manejo de cada aplicador, ordem e período da aplicação do método de estresse - tais procedimentos se valem de simulações de transporte, perseguição com redes de captura, variações de parâmetros físico-químicos da água e competição social interespecífica para atingir o mesmo objetivo.)

também que outras técnicas de adensamento⁴ populacional não atendem as boas práticas de manejo preconizadas em piscicultura por interferirem na alimentação dos animais. Assim considera-se que a metodologia foi reprodutível ao longo do tratamento e adequada para estudo comparativo de desempenho zootécnico.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE O LEUCOGRAMA DAS TRUTAS

Os parâmetros hematológicos relativos ao leucograma de peixes variam entre indivíduos da mesma espécie dependendo de seu estado fisiológico, além de fatores como sexo, estado nutricional, nível de amadurecimento gonadal e manejo alimentar. Assim, é importante avaliar animais que estão no mesmo estágio de desenvolvimento e condições de manejo.

No presente trabalho, o critério de seleção dos animais considerando o sexo feminino e a mesma idade, garantiu a homogeneidade dos grupos, sendo que os animais apresentavam massa e comprimento médios com variação não superior a 5% e 2%, respectivamente.

Os valores médios das contagens total e relativa de leucócitos estão apresentados na Tabela 4.

Observa-se que a contagem global de leucócitos, após 30 dias de experimento nos animais do grupo controle foi significativamente maior ($p < 0.05$) quando comparado com o observado no dia inicial, porém esta não diferiu dos animais do grupo tratado com a preparação probiótica. O mesmo foi observado com os animais que foram estressados e tratados com probióticos (EP) quando comparado com a contagem do dia inicial, mas não com os animais que somente foram estressados (ER). A contagem de leucócitos dos animais do grupo controle se manteve significativamente maior ($p < 0.05$) após 60 dias de experimento quando comparado ao dia inicial.

⁴ (diminuição da densidade por limitação do espaço disponível nos tanques ou realocação dos animais em tanques menores)

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão das contagens absolutas de leucócitos durante o experimento com truta, *Oncorhynchus mykiss* alimentadas com dieta contendo probiótico e submetidos a estresse de manejo.

DIA	Grupos	Leucócitos (μL)	Linfócitos (μL)	Neutrófilos (μL)	Monócitos (μL)
30	inicial	18.256,4 $\pm$ 2.585,2 ^a	16.363,2 $\pm$ 2.257,6 ^a	1.360,5 $\pm$ 587,0 ^a	523,2 $\pm$ 247,9 ^a
	NR	24.261,4 $\pm$ 6.906,0 ^b	22.949,0 $\pm$ 6.642,3 ^b	876,1 $\pm$ 360,2 ^{ab}	433,3 $\pm$ 177,2 ^a
	NP	22.114,4 $\pm$ 2.791,8 ^{ab}	20.722,4 $\pm$ 2.457,9 ^{ab}	392,1 $\pm$ 262,2 ^b	998,0 $\pm$ 397,5 ^b
	ER	21.937,0 $\pm$ 4.990,4 ^{ab}	20.429,5 $\pm$ 4.449,4 ^{ab}	639,8 $\pm$ 317,5 ^{ab}	865,6 $\pm$ 414,0 ^{ab}
60	EP	24.333,0 $\pm$ 2.672,7 ^b	23.161,4 $\pm$ 2.715,4 ^b	473,6 $\pm$ 165,2 ^b	695,5 $\pm$ 209,0 ^{ab}
	inicial	18.256,4 $\pm$ 2.585,2 ^a	16.363,2 $\pm$ 2.257,6 ^a	1.360,5 $\pm$ 587,0 ^a	523,2 $\pm$ 247,9 ^a
	NR	25.728,7 $\pm$ 7.972,0 ^b	24.018,3 $\pm$ 8.113,4 ^b	1.111,0 $\pm$ 1031,0 ^{ab}	597,1 $\pm$ 274,6 ^a
	NP	18.889,8 $\pm$ 3.625,9 ^{ab}	17.696,0 $\pm$ 3.489,3 ^{ab}	393,1 $\pm$ 206,1 ^b	799,1 $\pm$ 154,8 ^a
	ER	23.260,7 $\pm$ 6.461,1 ^{ab}	21.696,1 $\pm$ 6.072,4 ^a	691,6 $\pm$ 389,0 ^a	871,6 $\pm$ 298,5 ^a
	EP	19.276,1 $\pm$ 4.094,0 ^a	17.121,8 $\pm$ 3.159,8 ^a	1.399,4 $\pm$ 1088,8 ^a	753,0 $\pm$ 351,0 ^a

Grupo NR – grupo controle – os animais receberam apenas ração; Grupo ER – grupo estresse de manejo e ração; Grupo NP – grupo suplementado com a preparação probiótica; Grupo EP – grupo estresse e suplementação com a preparação probiótica.

Médias comparadas entre o dia inicial e 30; inicial e 60.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente segundo o teste Tukey ($p>0.05$).

Não foram observadas diferenças significativas na contagem de leucócitos nos animais dos grupos submetidos ao estresse de manejo (ER e EP) após 60 dias de experimento, conforme demonstrado na Tabela 4.

De acordo com Ranzani-Paiva (2004), os linfócitos são as células mais abundantes no sangue circulante da maioria das espécies de peixes e são responsáveis pela imunidade humoral e celular, além de serem importantes no reconhecimento de antígenos.

No que se refere à contagem de linfócitos, observa-se que os valores obtidos após 30 dias foram significativamente maiores ($p < 0.05$) nos animais do grupo NR quando comparadas aos valores do dia inicial, porém esta não diferiu estatisticamente ($p > 0.05$) do grupo tratado (NP). O mesmo foi observado nos animais do grupo EP quando comparado aos valores do dia inicial, mas não com o grupo ER. A contagem de linfócitos nos animais do grupo NR permaneceu significativamente maior ($p < 0.05$) após 60 dias de experimento em relação à contagem no dia inicial. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0.05$) nas contagens de linfócitos nos animais dos grupos submetidos ao estresse de manejo (ER e EP) após 60 dias de experimento.

No tocante aos neutrófilos, Tavares Dias (2006), reporta que são os principais glóbulos brancos que tem a função de defender o organismo contra infecções bacterianas, as quais, juntamente com os anticorpos, são eliminadas pelo mecanismo de fagocitose.

Nesse contexto, os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que houve diferença na contagem de neutrófilos nos animais dos grupos tratados com probiótico (NP e EP) decorridos 30 dias de tratamento, que apesar de não diferirem da contagem de neutrófilos dos grupos NR e ER, foi significativamente menor quando comparada ao dia inicial. No entanto, após 60 dias de experimento, a diminuição da contagem de neutrófilos somente foi observada nos animais do grupo NP, quando comparado ao dia inicial. O aumento significativo ($p < 0.05$) na contagem de neutrófilos do grupo EP após 60 dias de experimento foi notadamente maior (cerca de 300%) quando comparado a mesma contagem no dia 30. Ainda que essa variação na contagem tenha se destacado entre os grupos

no dia 60, o aumento não foi significativo quando comparado ao dia inicial. Os valores elevados de desvio padrão da média das contagens de neutrófilos do grupo EP indicam que os animais reagiram de forma diferente quando submetidos ao estresse.

De acordo com Ranzani-Paiva (2004), monócitos são glóbulos brancos com atividade fagocítica e os únicos dentre os leucócitos de peixes com capacidade de regenerar seus lisossomos. São células hábeis na resposta inflamatória, pois migram através dos vasos sanguíneos, por diapedese, para o combate de antígenos, passando a ser chamados de macrófagos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Os valores médios referentes à contagem de monócitos nos animais do grupo NP foram significativamente superiores ($p < 0.05$) quando comparados aos valores do dia inicial e ao grupo NR, após 30 dias de tratamento. A contagem de monócitos não apresentou diferenças estatísticas entre os animais dos grupos submetidos ao estresse de manejo (ER e EP), assim como quando comparada ao dia inicial. Após 60 dias de experimento, não foram observadas diferenças significativas nas contagens de monócitos nos animais submetidos aos tratamentos avaliados no presente trabalho. De acordo com Sopinska (1985), elevações nas contagens de leucócitos como os monócitos, mesmo que sutis, refletem a intensificação do mecanismo de defesa celular.

De acordo com Tavares-Dias (2006) e Silva et al. (2012), eosinófilos e basófilos são granulócitos provavelmente relacionados a processos alérgicos, inflamatórios e, em alguns casos, a peixes portadores de alguma parasitose. De acordo com esses autores, esta característica se deve à presença de compostos vasoativos em suas organelas citoplasmáticas, que atuam na resposta inflamatória alterando a permeabilidade celular dos vasos sanguíneos. No presente estudo não foram encontrados eosinófilos e basófilos no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos, corroborando com os resultados encontrados por Silveira et al. (2005) e Buenaño (2010), os quais não encontraram basófilos e eosinófilos no hemograma de trutas em diferentes estágios de maturidade.

Diante dos resultados da contagem relativa de leucócitos apresentada, ficou demonstrado que a variação no leucograma dos animais ocorreu principalmente devido ao aumento na contagem de linfócitos no grupo EP, e pelo aumento da contagem de linfócitos e monócitos no grupo NP, após 30 dias de tratamento. Estes resultados corroboram com os reportados por Irianto e Austin (2002) e Faramarzi et al. (2011), que reportaram valores semelhantes para às contagens de linfócitos e monócitos. A mudança no perfil de glóbulos brancos, observada nos tratamentos, sugere que a suplementação com probióticos contribui para melhoria no estado de saúde dos animais, devido ao incremento da resposta imune mediada por células.

Foi observado que a alteração no número absoluto de leucócitos dos grupos ER e EP aconteceu em decorrência da diminuição da contagem de neutrófilos e aumento da contagem de linfócitos. No entanto, essa alteração também é observada em animais que se encontram intensamente estressados, e apresentam baixa resistência às doenças, conforme descrito por Mazeaud et al. (1997).

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE A CORTISOLEMIA E GLICEMIA DAS TRUTAS

O cortisol é o principal hormônio corticosteroide presente na maioria dos peixes teleósteos, cujos níveis plasmáticos são importantes indicadores de estresse, juntamente com níveis de glicose e alguns metabólitos. Desta forma, no presente trabalho avaliou-se os níveis de cortisol e glicose no sangue dos peixes submetidos a diferentes tratamentos, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.

Estes resultados permitem observar que não houve diferenças significativas ($p > 0.05$) no tocante a cortisolemia quando os peixes foram submetidos aos diferentes tratamentos. Embora não significativos, verifica-se após 30 dias de experimento que os níveis de cortisol se encontraram ligeiramente aumentados quando os animais foram submetidos ao estresse de manejo (ER e EP).

Após 60 dias de tratamento os valores médios de cortisol encontrados nos grupos submetidos a diferentes tratamentos não diferiram significativamente ($p>0.05$). Essa constatação sugere que os animais adaptaram-se ao estresse crônico de manejo, pois foi observada diminuição das médias dos níveis de cortisol no dia 60, cujos valores no dia 30 se encontravam ligeiramente aumentados em relação ao dia inicial.

Os resultados referentes aos níveis de cortisol (Tabela 5) estimados pelas coletas no dia inicial, 30 e 60 se encontram dentro do valor basal para salmonídeos, conforme descrito por Oba et al. (2009).

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão das concentrações de cortisol e glicose em trutas *Oncorhynchus mykiss*, submetidas a diferentes tratamentos.

DIA	Grupos	Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	Glicose (mg/dL)
inicial		4,23 $\pm$ 2,24 ^a	135,8 $\pm$ 21,1 ^a
30	NR	3,51 $\pm$ 1,92 ^a	101,7 $\pm$ 26,2 ^a
	NP	4,58 $\pm$ 2,69 ^a	110,4 $\pm$ 21,5 ^a
	ER	6,25 $\pm$ 2,10 ^a	100,6 $\pm$ 30,5 ^a
	EP	6,03 $\pm$ 2,07 ^a	113,0 $\pm$ 16,6 ^a
60	NR	3,86 $\pm$ 2,00 ^a	97,1 $\pm$ 10,7 ^{ab}
	NP	3,74 $\pm$ 2,18 ^a	98,7 $\pm$ 15,9 ^{ab}
	ER	4,19 $\pm$ 2,17 ^a	82,6 $\pm$ 19,4 ^b
	EP	4,69 $\pm$ 1,19 ^a	82,1 $\pm$ 31,3 ^b

Grupo NR – ração controle; Grupo NP – ração suplementada com a preparação probiótica; Grupo ER – estresse de manejo e ração controle; Grupo EP – estresse e ração suplementada com a preparação probiótica.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p>0.05$).

Segundo Pottinger et al. (1992), Pankhurst; Van der Kraak (2000), Weil et al. (2001), em uma dada população de peixes submetida a situação de estresse, são encontrados animais que apresentem níveis consideravelmente elevados de cortisol, bem como os que apresentem níveis normais, ambos demonstrando desempenho similar.

No que se refere à glicemia não foi observado diferenças significativas após 30 dias de experimento nos animais submetidos a diferentes tratamentos. Dentre os animais dos grupos ER e EP foram observados após 60 dias de tratamento, índices glicêmicos significativamente mais baixos ($p < 0.05$) quando comparados ao dia inicial, porém os valores médios da glicemia foram estatisticamente iguais entre os diferentes grupos.

Foi verificado uma diminuição da glicemia nos animais dos diferentes tratamentos ao longo dos 60 dias de experimento, entretanto, apenas significativo estatisticamente nos grupos submetidos ao estresse crônico de manejo. Segundo Staurnes et al. (1994), a redução no índice glicêmico é atribuída à redução das reservas de glicogênio hepático, o que ocorre após o aumento da secreção de cortisol, característica da adaptação do organismo ao estresse.

De acordo com Oba et al. (2009), o estresse afeta negativamente o metabolismo causando diminuição das reservas energéticas, resultando em baixo crescimento, uma vez que os animais sob estresse não se alimentam.

Mesmo apresentando pequena oscilação após 30 dias de tratamento, os níveis de cortisol sugerem que os animais dos grupos submetidos ao estresse crônico de manejo (ER e EP), alcançaram equilíbrio fisiológico diante desse desafio a partir do dia 30 até o dia 60. A diminuição da glicemia basal a níveis significativamente mais baixos ($p < 0.05$) quando comparado ao dia inicial, foi acompanhada de reestabelecimento dos níveis de cortisol apresentados pelos animais no início do experimento. No entanto, não ocorreram interferências negativas no desempenho zootécnico dos animais nos grupos submetidos ao estresse, ao longo dos 60 dias de tratamento.

Neste contexto, vale salientar que resultados opostos foram reportados na literatura, (LARA-FLORES et al., 2003; TAOKA et al., 2006; ROLLO et al., 2006;

RAJ et al., 2008) quando microrganismos probióticos foram avaliados na dieta de peixes. Nesses estudos, os animais submetidos a diferentes agentes estressores bem como desafiados com diferentes patógenos, apresentaram maior tolerância ao estresse demonstrada por diminuição na taxa de mortalidade, aumento nas taxas de crescimento, aumento de resistência à doenças e diminuição dos índices de cortisol.

No entanto pode-se afirmar que o “*pool*” de espécies do gênero *Lactobacillus* não favoreceu a diminuição dos níveis de cortisol dos grupos tratados nas condições realizadas no presente experimento.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que

- A técnica de incorporação das cepas probióticas na ração foi eficaz e permitiu a manutenção da viabilidade das células.
- A preparação probiótica avaliada não influenciou significativamente o desempenho zootécnico das trutas submetidas ao desafio de estresse.
- A inclusão da preparação probiótica na dieta dos peixes aumentou significativamente o número de eritrócitos e monócitos.
- A suplementação da dieta das trutas com a preparação probiótica não contribuiu para a redução da cortisolemia das trutas.
- O manejo de estresse provocou diminuição do índice glicêmico das trutas.

REFERÊNCIAS

AL-DOHAIL, A.M., HASHIM, R. AND ALIYU-PAIKO, M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. **Aquacult Res.**, v. 40, p. 1642-1652, 2009.

ALIZADEH, M.; FARZANFAR A; NAFISI-BAHABADI, M. The effect of probiotic Bioplus 2B on growth performance and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) larvae. **Indian J. Fish.**, 58, p. 55-59, 2011.

ANDLID, T.; VA'ZQUEZ-JUA'REZ, R.V.; GUSTAFSSON, L. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Microb. Ecol.**, v. 30, p. 321-334, 1995.

AUSTIN, B.; AL-ZAHRANI, A.M.J. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J Fish Biol**, v. 33, p.1-14, 1988.

AUSTIN, B. 1998. Biotechnology and diagnosis and control of fish pathogens. **J. Mar. Biotechnol.**, v.,6, p 1-2, 1998.

ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina.** 2007. 54 f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

AZARI AH, HASHIM R, AZARI TAKAMI G, FARABI SMV, DARVISH M AND SAFARI R. Effect of prebiotic (GroBiotic®-A) on the growth performance and intestinal microflora on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* - Walbaum). **Journal of research in Biology**, v. 5, p. 325-334, 2011.

BAGHERI, T.; HEDAYATI S.A.; YAVARI, V.; ALIZADE M.; FARZANFAR A., Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 43-48, 2008.

BALCÁZAR, J.L. **Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*.** National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador, **Vet. Microbiol.**, v. 114, p. 173-186, 2003.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. **J. Aquacult. Trop.**, v. 19, p. 239-242, 2004.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZAZUELA, I.; CUNNINGHAM, D., VANDRELL, D., MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. Microbiol.**, v. 114, p. 173-186, 2006.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. D.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Braz. J. Food Technol.**, v. 6, n.1, p. 119-126, jan./jun. 2003.

BILANDŽIĆ N, et al.. Elimination of chloramphenicol in rainbow trout. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 62, p. 215-220, 2011.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 125-131, 2002.

BLAXHALL P. C.; DAISLEY K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **J. Fish Biol.**, v. 5, p. 771-78, 1973.

BOHNHOFF, N.; DRAKE, B. L.; MULLER, C. P.. Effect of streptomycin on susceptibility of the intestinal tract to experimental salmonella infection. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 86, p 132–7, 1954.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. Campinas. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2005.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura, **Boletim Estatístico da Pesca e da Aquicultura**, fev. 2012.

BRODNIOWICZ-PROBA, T. Human plasma fractionation and the impact of new technologies on the use and quality of plasma-derived products. **Blood Reviews**, v. 5. p. 245-257, 1991.

BUENAÑO, C.M.V. Hemograma de trucha arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) em três etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. Boletín Técnico 9, **Serie Zoológica**, v. 6, p. 1-14. Jun. 2010.

CABRAL. K.G. Avaliação do produto Biocitro® PG no desempenho produtivo de truta arco-íris. Palestra proferida no XVII ENCONTRO NACIONAL DA ABRAT, Campos do Jordão, 2006.

CAHILL, M. M. Bacterial flora of fishes: a review. **Microb. Ecol.**, v. 19, p. 21-41, 1990.

CARNEVALI, O.; DE VIVO L.; SULPIZIO,R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 430-438, 2006.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal Food Protection**, v. 61, p. 1636–1643, 1998.

CORRÊA-JUNIOR, L.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. **Incorporação artesanal de probiótico na ração comercial**, 2009. Disponível em <http://www.pesca.sp.gov.br/9recip>. Acessado em 13, mai. 2014.

COUTINHO, T.S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre a sanidade de bezerras desmamados e bezerras em fase de aleitamento**. 2012 Tese (Doutorado), ed. reimpr., corr. – Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2012.

CRUZ, A. G.; FARIA J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.

DAGA´ P. ; FEIJOO G.; MOREIRA M. T.; COSTAS D.; VILLANUEVA A. G.; LEMA J. M. Bioencapsulated probiotics increased survival, growth and improved gut flora of turbot (*Psetta maxima*) larvae. Publicado on line por **Aquacult Int** disponível on-line no endereço: http://download.springer.com/static/pdf/275/art%253A10.1007%252Fs10499-012-9556-y.pdf?auth66=1360268747_c86dcda25ff652f59799113922f7279f&ext=.pdf. Acessado em 23/01/2013.

DIAS, J.L.S. O Futuro da Truticultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**. v.36 Disponível on-line no endereço: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/36/Truticultura.asp>

DIAS, D.C. **Probiótico no desempenho produtivo, hematologia e migração de macrófagos do matrinxã, *Brycon amazonicus***. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal, 2010.

DIREKBUSARAKOM, S.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y.; RUANGPAN, L.; DANAYADOL, Y. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. **J. Mar. Biotechnol.** v. 6, p. 266-267, 1998.

DRABKIN D. R. Crystallographic and optical properties of human haemoglobin: A proposal for the standardization of haemoglobin. **Am. J. Med. Sci.**, v. 209, p. 268-270, 1945.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotics use in poultry: **Brazilian Journal of Poitry Science**, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.

ERVIK, A.; THORSEN, B.; ERIKSEN, V.; LUNESTAD, B. T.; SAMUELSEN, O. B. Impact of administering antibacterial agents on wild fi sh and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fi sh farms. **Dis Aquat Organ**, v. 18, p. 45-51, 1994.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. HOLDEN, M. J.; RAITT D. F. S. Methods of Resource Investigation and their Application. Disponível em:

<http://www.fao.org/DOCREP/003/F0752E/F0752E00.HTM>

Acesso em: 18, jan. 2013.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. HOLDEN, M. J.; RAITT D. F. S. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, FAO, 2001. 34 p. Disponível em:

http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

Acesso em 18, jan. 2013.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma: FAO, 2012. 231 p. Disponível em: www.fao.org/icatalog/inter-e.htm Acesso em 17, jan. 2013.

FARAMARZI, M.; KIAALVANDI, S.; LASHKARBOLOOKI M.; IRANSHAKI F. The Investigation of *Lactobacillus acidophilus* as Probiotics on Growth Performance and Disease Resistance of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Americam – Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 6, n. 1, p. 32-38, 2011.

FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.** v. 48, p. 149-158, 2006.

FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Probióticos: uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. **Biotecnologia**, v. 8, p. 40-43, disponível on-line no endereço <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio08/probioticos.pdf>, (avaliado em 01/03/2012)

FULLER, R. A review: probiotic in man and animals. **Journal Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.1, p.1034-1039, 1989.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquacult.** v. 180, p. 147-165, 1999.

GARRIQUES, D.; AREVALO, G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: BROWDY, C. L., HOPKINS, J. S. (Eds.), **Swimming through troubled water**. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p. 53-59, 1995.

GIBSON G.R.; ROBERFROID M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; OVIYA, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of

tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 30, p. 1-7, 2013.

GIRONES, R.; JOFRE, J. T.; BOSCH, A. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. **Can. J. Microbiol.**, v. 35, p. 1015-1021, 1989.

GOLDENFARB P. B.; BOWYER F. P.; HALL T.; BROSIUS E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **Am. J. Clin. Pathol.** V. 56, p. 35-39, 1971.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquacult.** v. 191, p. 259-270, 2000.

GÓMEZ, G.D.; BALCÁZAR, J.L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish FEMS. **Immunol. Med. Microbiol.** v. 52, p. 145-154, 2008.

GONÇALVES, A. **Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina** – Tese (Doutorado) Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” Centro de Aquicultura da UNESP Paulista-Jaboticabal, 2009.

GORBACH, S. L. Probiotics in the Third Millennium. **Digest Liver**, v. 34 (Suppl.2), p. 2-7, 2002.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T.F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 969-973, 1999.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar: Boletim de Tecnologia**, v. 101, p. 12-22, 2002.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G.J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.** v. 39, p. 237-238, 1998.

GULLIAN, M.; RODRIGUEZ, J. Immunostimulant qualities of probiotic bacteria. **Global Aquacult.** v. 5, p. 52-54, 2002.

HAGHIGHI, M. Laboratory Methodes of Fish Hematology. **Aquaculture Science Publications**, p. 29-71, 2010.

HANSEN, G. H.; E. STRØM; OLAFSEN, J. A. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. **Appl. Environ. Microbiol.** v.58, p. 461-470, 1992.

HAVENAAR R, HUIS IN'T VELD JHJ (1992): Probiotics: A general view. In: WOOD BJB: **The Lactic Acid Bacteria**, Chapman & Hall, 1992. v. 1, p. 209-224.

HERSHBERGER, W. Genetic variability in rainbow trout populations. **Aquaculture**. v.100, p. 51-71, 1992.

HUBER, I. B.; SPANGGAARD, K.F.; APPEL, L.; ROSSEN, T.; NIELSEN, L. 2003 Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 117-132, 2003.

INGERSLEV, H.; BOYE, M.; DALSGAARD, INGER; MADSEN, L. Studying the gut microbiota using rainbow trout as a model: the dynamics of the microbiota changes after first feeding. In: **ISME14** (INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY) – Abstracts, 2012.

ISHIKAWA, M. M., et al., **Procedimentos básicos para coleta de Sangue em Peixes**. Dourados: EMBRAPA, 2010. Circular Técnica

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

IRIANTO, A., AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Dis.** n. 25, p. 333-342, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. **Biologia celular e molecular**. Guanabara Koogan, 9ª Ed., 2012.

KAMEI, Y.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y.; KIMURA, T. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. **Microbiol. Immunol.** n. 32, p. 67-73, 1988.

KOPELOFF, N. **Lactobacillus acidophilus**. 1ª ed., 1926.

KUBITZA, F. Antecipando-se às Doenças na Tilapicultura. **Panorama da Aqüicultura**. v.15, n.89, p.15 - 23, 2005.

KUMAR, R.; MUKHERJEE, S. C.; RANJAN, R.; NAYAK, S. K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. **Fish and Shellfish Immunology**, n. 24, p. 168-172, 2008.

LANCINI, J. B. Fatores exógenos na função gastrointestinal, aditivos. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA. **Fisiologia da digestão e absorção das aves**. Campinas, p. 99-126, 1994.

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*). **Aquacult.** n. 216, p.193-201, 2003.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147,n.1, p.747-748, 1965.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, v.11, p.1-17, 2001.

LORENTE, B. F.; SERRA, J. D. Alimentos funcionales: probióticos. **Acta Pediatr Esp.**, v.59, p. 150-155, 2001.

LU, X.W.; DANG, Z.; YANG, C. Preliminary investigation of chloramphenicol in fish, water and sediment from freshwater aquaculture pond. **Int J. Environ Sci Technol**, n.6, p. 597- 604, 2009.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo. Prentice Hall, 2004.

MAHONEY, J.B.; MCNULTY, K.K. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v.121, p. 261-268, 1992.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M.; Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p.201-212. 1997.

MEHRABI, Z.; FIROUZBAKHS, F.; JAFARPOUR, A. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n.96, p. 474–481, 2012.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M.; MASCIOLI, A. S.; COLPINI, L. M. S.; FRECCIA, A. 2008. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, n. 9, p. 804-812, 2008.

METCHNIKOFF, E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: **THE PROLONGATION OF LIFE: OPTIMISTIC STUDIES**. London: W. Heinemann, London, p. 161-183, 1907.

MERRIFIELD, D.L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, n. 302, p. 1-18, 2010.

MERRIFIELD, D.L.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M.; DAVIES, S.J.; Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* - Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. **Aquaculture Nutrition**, n.16, p. 496-503, 2010.

MORIARTY, D.J.W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquacult.** n.151, p. 333-349, 1997.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, n. 164, p. 351–358, 1998.

NAVARRETE, P.; MAGNE, F.; MARDONES, P.; MACARENA RIVEROS M.; OPAZO, R.; SUAUA, A.; POCHART, P.; ROMERO, J. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **FEMS Microbiol Ecol**, v. 71, p. 148-156, 2010.

NAKANDAKARE, I. B. **Inclusão de probióticos no processamento de ração para tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* variedade GIFT**, Dissertação de Mestrado, Instituto de pesca, São Paulo, 2010.

NUTRITION DATA, 2013. Informação nutricional da carne de truta. Disponível em <http://nutritiondata.self.com/facts/finfish-and-shellfish-products/4142/2>, Acessado em 05, jun. 2013.

NIKOSKELAINEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G.; OUWEHAND, A. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases. In **fish. Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, p. 2430-2435, 2001.

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; BYLUND, G.; SALMINEN, S.; LILIUS, E.M. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish Shellfish Immunol.** v.15, n. 443-452, 2003.

NIETO T.P.; TORANZO, A.E.; BARJA, J.L. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north-west of Spain. **Aquaculture**, v. 42, p.193-206, 1984.

PASCHOAL, V.; NAVES, A; FONSECA, A. **Nutrição clínica funcional: dos princípios à prática clínica**. 1ª Ed. revisada. São Paulo: VP editora, 2010.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr.Health**, v.29, p.4-8, 1974.

PANKHURST, N.W.; VAN DER KRAAK, G. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the actions of cortisol. **Genetic Comparative Endocrinology**, v. 117, p. 225-237, 2000.

PARLAMENTO EUROPEU, Regulamento (CE) N.º1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal – Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1831:en:NOT> Acessado em 17 de jan. 2013.

PATTERSON, J.A., BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Sci.** v. 82, p. 627-631, 2003.

PAYAM, A., AFESHIM, J., HAMID, M., AMIN, K.S., Effect of Dietary Probiotic on Survival and Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Adv. Environ. Biol.** n. 5, v. 6, p. 1161-1165, 2011.

PICCHIETTI, S.; FAUSTO, A.M.; RANDELLI, E.; V. CARNEVALI, O.; TADDEI, A.R.; BUONOCORE, F. SCAPIGLIATI, G.; ABELL, L. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strains 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. 368-375, 2009.

POTTINGER, T.G.; PRUNET, P.; PICKERING, A.D. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. **Genetic Comparative Endocrinology**, v. 88, p. 454-460, 1992.

PORTO-FORESTI, F. et al. Truta Arco-Íris – os brasileiros já a desejavam desde 1913. **Panorama da Aquicultura**, n. 69, Jan/Fev, 2002.

PROENÇA, C.E.M., et al. Plataforma do Agronegócio da Truticultura, Documento técnico, Departamento de Pesca e Aquicultura, 2001. Disponível em: <http://aquicultura.br/abrat/plataforma/plataforma.pdf>, Acessado em 23 de jan.2013.

PRIEUR, G.; NICOLAS, J.L.; PLUSQUELLEC, A.; VIGNEULLE, M. Interactions between bivalves molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v.28, p. 227-352, 1990.

RANZANI-PAIVA, M. J T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes** – Maringá : Eduem, 2013.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A. Hematologia de peixes Brasileiros In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. p. 89-120, 2004.

RAJ, A.J.A.; SURESH, V.; MARIMUTHU, K.; APPELBAUM, S. Probiotic performance on fish fry during packaging, transportation stress and post-transport condition. **J. Fish. Aquac. Sci.** n. 3, p. 152-157, 2008.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). **Aquaculture**, v. 191, p. 271-288, 2000.

RETTGER, L.F.; LEVY, M.N.; WEINSTEIN, L.; WEISS, J.E. **Lactobacillus acidophilus and its therapeutic application**. London: Yale University Press, 1935.

RINGØ, E., GATESOUE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177-203, 1998.

RODRIGUES, G.P. Probióticos. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais**: aprendendo a aprender. 2ª ed. São Paulo: Savier, 2008, p.477-487.

ROBERTSON, P.; O'DOWD, C.; BURRELLS, C.; WILLIAMS, P.; AUSTIN, B. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Aquaculture**, v. 185, p. 235-243, 2000.

ROLLO, A.; SULPIZIO, R.; NARDI, M.; SILVI S.; ORPIANESI C.; CAGGIANO M.; CRESCI A.; CARNEVALI, O. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. **Fish Physiol Biochem**, v. 32, p.167-177, 2006.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados Em: TAVARES- DIAS, M. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**, EMBRAPA Amapá, Macapá, p. 226-246.

OLIVEIRA, A. M.; CYRINO, E. P. Estresse dos peixes em piscicultura intensiva, 2003. Disponível em http://www.pisciculturapaulista.com.br/pdf/estresse_peixes.pdf
Acessado em 17 de abri. 2014.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SAKATA, T. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. In: Lesel, R. (Ed.), **Microbiology in Poecilotherms**.Amsterdam, Elsevier, p. 171-176, 1990.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture Ames**. v. 172: 63 – 92, 1999.

SALMINEN, S. et al. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p.107 - 110, 1999.

SAMPATH, K.; JAMES, R.; AKBAR ALI, K. M. Effects of copper and zinc on blood parameters and prediction of their recovery in *Oreochromis mossambicus* (pisces). **Indian Journal of Fisheries**, v. 45, p. 129-139, 1998.

SCHREZENMEIR J.; VRESE, M.; Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition -**Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2, p. 361s-364s, 2001.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SCHOLZ, U.; GARCIA-DIAZ, G.; RICQUE, D.; CRUZ-SUAREZ, L.E.; VARGAS-ALBORES, F.; LATCHFORD, J. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile

Penaeus vannamei by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture**, v.176, p. 271– 283, 1999.

SILVA, A.S.; LIMA, J.T.; BLANCO, B.S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). Publicação do Conselho Regional de Medicina Veterinária-RN. **Rev. Centauro**, v. 3, n. 1, p. 24-32, 2012. Disponível em http://www.crmvrn.gov.br/crmv/arquivos/hematologia_em_peixes.pdf Acesso em: 18 de jan. 2013.

SILVEIRA, R.; MARTÍNEZ, M.; ASCENCIO, F. Características morfológicas e histoquímicas de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus* S. Cichlidae. **REDVET**. v. 6, p.10. Disponível em: www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html. Acesso em: 18 de jan. 2013

SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, J.; SICK, E.B.; PIPPER, C.B.; MARTINUSSEN, T.; SLIERENDRECHT, W.J.; GRAM, L. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. **Environ. Microbiol.** v. 3, 755-765, 2001.

STAURNES, M.; SIFHOLT, T. PEDERSEN, H.P.; RUSTAD, T. Physiological effects of simulated high-density transport of atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 119, p. 381-391, 1994.

STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEN, T. G. **Alimentos “Funcionais”** – Conceitos, contextualização e regulamentação. Juiz de Fora: Templo, 2007.

SOSINSKI, L.T.W. **Introdução da Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*) e suas consequências para a comunidade aquática dos rios de altitude do sul do Brasil**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2004, 84p.

SOPINSKA, A. Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns.III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. **Acta Ichthyology. Pisc.**,v. 15, p. 141-165, 1985.

TABATA, Y. A.; PORTZ, L. Truticultura em clima tropical. In: POSSEBOM, J. E. ; CYRINO; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Org.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004, p. 309-533.

TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, trombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 312-317, 2006.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ed.Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto-SP. p. 144, 2004.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J.; JEON, M.; BAI, S. C.; LEE, W.; YUGE, K.; KOSHIO, S. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. **Fisheries Science**. v. 72, n. 2, p. 310-321, Apr. 2006

TISSIER, H. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. **CR.Soc Biol**, v. 60, p. 359-361, 1906.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Metabolic and hormonal responses of matrixã, *Bricon cephalus* (Teleost: Characidae) to transport stress under influence benzocaine. **J. Aqua. Trop.**, v. 16, n.1, p. 75-85, 2001.

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

VENDRELL, I; BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZAZUELA, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J.L. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. **Comp. Immun. Microbiol. Infect.** v. 31, p. 337-345, 2008.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiol. Rev.** n. 30, p. 404-427, 2001.

WANG Y., LI J., LIN J./ Probiotics in aquaculture: Challenges and Outlook. **Aquaculture**, v. 281, p. 1-4, 2006.

WEIL, L.; BARRY, T.; MALISON, J. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. **Aquaculture**, v. 193, p. 373-380, 2001.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591- 625, 1997.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematological**, v. 51, p. 32-49, 1934.

ZIVKOVIĆ, R. Casopis Hravatske Akademije Medicinskih Znanosti. **Acta Medica Croatica** v. 53, n.1, p. 23-28, 1999.

APÊNDICES

Grupo NR				Grupo ER				Grupo NP				Grupo EP			
TAG	massa	comp	com std.	TAG	massa	comp	comp. Std	TAG	massa	comp	comp. Std	TAG	massa	comp	comp.std
0001BFAD07	394,5	30,2	26,4	0001BFAD07	394,5	30,2	26,4	0001CA50E8	395,3	30,9	27,6	0001BF62AE	402,2	30,3	27
0001C54135	390,3	30,2	26,4	0001BF6534	390,6	31,4	27,6	00013E1EEF	404,3	30,4	26,8	00013641D4	391,9	31,5	27,8
0001BF6887	382	30,9	27	000126A025	380,5	30,9	28	0001410D2E	388	31,6	27,6	0001CAAA65	382,2	31,5	28,4
0001C420CB	383,2	30,5	26,9	000121A558	385,7	30,5	27	0001E03655	370,2	30,3	26,7	0001452FD7	394,6	31,6	28
0001BF67EB	366,3	30,5	27	0001230D0F	355,4	30,5	27,1	000125D840	358,5	30	26,2	0001C91DC3	367,4	29,5	26,2
0001E0324C	360,8	30	26,2	00013E14EF	358	29,5	25,8	000140F842	361,1	30,3	26,7	0001E062B3	351,1	31	27,4
1269280	338,1	29,5	25,9	0001BFADFF	337,6	29,3	25,7	0001E05F70	343,8	29,7	26,3	000121DCA1	333,2	29	25,5
000125F75D	334,1	30,3	26,4	000125F6E3	339,5	29,8	26,2	0001E0313B	338,1	30,8	27,2	0001BF7E64	336,7	29,6	26
0001BFBEAE	403,8	30	26,5	000124CB81	406	30,9	27,5	0001BF8723	398	31,5	27,8	000124BD57	392,4	30,8	27,2
00012C62C8	389,7	31,6	28,1	0001BF6EB6	397,8	30,6	27	0001BF6CC5	394	30,9	27,6	0001BF8603	396,6	30,8	27,3
000125D8E3	382	30,3	26,8	0001F9D892	370	30,9	27,5	000125D358	374,4	29,9	26	0001BFA4E3	377,6	30	26,2
0001FAC346	383,2	30,7	27	0001FA19A8	384,1	30,4	26,7	0001BF89EB	373,5	31,7	28	0001E0869D	369,2	31	27,5
0001D38A51	346,1	30	26,2	0001BFBBFE	352,7	29,7	26,5	0001C33F7D	352,8	30	26,5	000137E1C2	363	30	26,2
0001CA6FEE	353,5	30,8	27,3	0001E06472	348,8	30	26,9	000121E13D	365	30,5	27,2	0001449A9D	349,7	29,5	25,8
0001BF6AC9	336,1	30	25,7	0001E0651B	338,2	30	26,8	0001BF8E5A	327,2	28,8	25	000126A654	356,3	29,5	26,2
0001E05D12	330,6	29	26,2	0001448A7C	335,7	29,6	26,5	0001CAB2E8	323,3	29,8	26,5	0001E064C0	335,1	29,5	26
000136BA4B	398,3	32	29	0001E05808	392,7	31,7	28,3	0001BF8363	403,3	31,6	28,5	0001BF6E07	388	31,5	27,9
000121A5D7	373,6	31,4	28,4	0001E05C81	381,7	31,1	27,5	00012F41C8	372,1	29,8	26,6	00012C5B43	387,9	30,6	27,4
0001E066C2	388,8	31,5	28,5	00012626DF	377,2	30,5	26,9	0001422BA6	355,7	30,3	27,1	0001E03833	378,2	31,1	27,4
0001E02922	360,2	30,1	27	000125D250	362,3	29,9	26,5	0001E05FFE	376	30,3	26,8	000121B33D	371	29,9	26,8
0001231ABA	355,3	31	28,2	000140F9AF	352,3	30	26,3	000125F98C	343,9	29,3	26,1	0001BF8258	342,7	29,7	26,2
0001E08686	360,8	29,1	26,6	00012475DD	356,8	29,9	26,4	0001C91E94	363,2	30	26,2	00012F302F	336,5	29,8	26,3
0001BF8345	342,7	29,2	25,7	00012695B5	350,1	28,7	25,6	0001BF8D98	341,5	30,2	26,7	0001263C6F	332,2	29,5	26,3
00012351C1	326,2	29,3	26	000121C75D	327,1	30,3	26,7	000137CE48	324,1	29,9	25,7	0001DFBE29	336,6	29,9	26,1
00012504DB	378,2	30,7	27,5	0001F8E8E2	379,9	30,2	27,6	0001BE904A	380,7	29,9	26,6	0001C93F27	358,2	30,6	27
000126B44E	370,1	30,2	27,1	000127DF3A	377,4	30,2	27,5	00012F2918	360,2	29,8	26,1	00012F5322	377,3	31,1	27,7
000126378D	365	30,4	27	0001E03B5B	348,6	30,3	26,6	00012682C2	358,5	29,7	26,2	0001FBD487	364,2	28,2	25,1
0001E0939A	357	30,4	27,1	0001C948C6	354	29,3	26	0001382A80	347,1	31	27,6	0001BE8D97	363,4	30,6	27,3
0001E039F6	358,3	30,2	26,9	0001E05BA9	349,7	30,2	27	0001236FE5	355,4	30,2	26,7	00012680DD	359,8	30,1	26,8
0001E05D3F	331,5	28,9	25,6	1230031	347,9	30,2	27,1	0001C92D9D	333,1	30,5	26,5	0001E066F7	340,1	28,9	25,7
000125D041	338	29,6	26	00012635BF	328,3	29,8	26,7	000125C21E	327,1	28,7	25,5	0001FB87A2	334,2	29,3	25,8
000137E369	341,8	30,1	26,6	000126A881	330,6	29	25,4	0001E0970B	330,5	29,3	26,1	000125D228	324,9	29,8	26,5
0001E03876	369,9	31,4	28,1	00001E06A27	355,2	29,8	26,7	000142B7B8	371,9	31,8	28,7	0001C38BD8	335,3	29	25,6
0001E05D9D	346,9	30,2	26,7	000125CFE7	325,3	29,4	26,5	0001BEBA26	353	29,8	26,4	00012AE89B	330,8	28,5	25,2
00012C6661	353,3	28,7	25,4	0001E09475	343,2	29,7	26,4	0001422A86	333,7	30	26,7	1238260	342,5	30,4	27,3
Média	362,6	30,3	26,9	Média	360,5	30,2	26,8	Média	360,0	30,3	26,8	Média	360,1	30,1	26,7
Soma	12690,2	-	-	Soma	12617,3	-	-	Soma	12598,5	-	-	Soma	12603,0	-	-
Desvio Padrão	21,65	0,81	0,89	Desvio Padrão	22,58	0,72	0,73	Desvio Padrão	23,45	0,77	0,80	Desvio Padrão	23,01	0,89	0,85
Coef. Variação	6%	3%	3%	Coef. Variação	6%	2%	3%	Coef. Variação	7%	3%	3%	Coef. Variação	6%	3%	3%

Apêndice B – Biometria dos grupos no dia da triagem: momento zero (MZ)

Grupo 3 NR / 4 ER / 7 NP / 8 EP							
TAG	massa/triagem	massa/dia 0	comp/triagem	comp/ dia 0	comp.std/triagem	comp. Std/ dia 0	Mas. das Visceras
0001BFB345	342,7	386,7	29,2	30,3	25,7	27,6	54,4
0001E05D12	330,6	367,6	29,0	29,8	26,2	27,4	52,5
000126378D	365,0	438,1	30,4	31,5	27,0	29,2	61,1
0001C948C6	354,0	417,9	29,3	30,1	26,0	27,6	65,7
0001E06472	348,8	400,3	30,0	31,1	26,9	28,6	56,4
00012695B5	348,6	407,6	30,3	29,4	26,6	27	65,7
0001BE904A	380,7	361,2	29,9	30,2	26,6	28	46,5
0001C91E94	363,2	428,9	30	30,9	26,2	28,2	62,6
0001BFB9D98	341,5	398,6	30,2	30,9	26,7	28,4	53
0001452FD7	392,4	423,1	30,8	32,3	27,2	29,6	62,8
0001FB87A2	334,2	385,1	29,3	29,9	25,8	27,1	58,1
1238260	342,5	362,2	30,4	31	27,3	28,6	50,2
Média	353,7	400,7	29,9	30,6	26,5	28,1	57,4
Soma	4244,2	4777,3			-		
Desvio Padrão	18,60	26,18	0,57	0,82	0,54	0,81	6,27
Coef. Variação	5%	7%	2%	3%	2%	3%	11%

Grupo 3 NR / 4 ER / 7 NP / 8 EP						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Especif.	Dados Complem.
0001BFB345	44,0	85,9	14,1	15,05	6,3%	Número de peixes
0001E05D12	37,0	85,7	14,3	14,03	5,3%	140
000126378D	73,1	86,1	13,9	16,23	10,4%	Taxa sobrevivência
0001C948C6	63,9	84,3	15,7	16,07	9,1%	100
0001E06472	51,5	85,9	14,1	14,88	7,4%	duração
00012695B5	59,0	83,9	16,1	15,32	8,4%	7
0001BE904A	-19,5	87,1	12,9	13,58	-2,8%	ração ofertada
0001C91E94	65,7	85,4	14,6	16,37	9,4%	170
0001BFB9D98	57,1	86,7	13,3	14,93	8,2%	Cons. Ração Méd.
0001452FD7	30,7	85,2	14,8	15,56	4,4%	34
0001FB87A2	50,9	84,9	15,1	14,93	7,3%	Cons. Ração Total
1238260	19,7	86,1	13,9	13,27	2,8%	4760
Média	50,2	85,46	14,5	15,1	7%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	16,13	0,94	0,94	1,00	2%	0,82
Coef. Variação	32%	1%	6%	7%	32%	Ganho massa total
Mediana	51,5	85,7	14,3	15,0	0,1	5838
Variância	236,6	0,6	0,6	0,8	0,0	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	9,5	0,6	0,6	0,6	0,0	0,49

Apêndice C – Biometria do grupo NR, no dia 30 e 60

Biometria - Grupo 3 NR / 30 dias						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
0001D38A51	121,6	85,2	14,8	17,25	38%	Número de peixes
000126B44E	158,0	84,6	15,4	18,90	49%	32
0001BFB687	111,5	86,5	13,5	17,98	35%	Taxa sobrevivência
0001E066C2	112,1	87,0	13,0	17,52	35%	100
0001E039F6	126,7	86,4	13,6	17,78	40%	duração
0001CA6FEE	102,6	87,6	12,4	16,04	32%	32
000125D8E3	136,3	85,2	14,8	18,89	43%	ração ofertada
00012351C1	125,2	86,5	13,5	16,35	39%	182,4
Média	120,6	86,5	13,5	17,3	37,7%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	13,24	0,90	0,90	1,15	4,1%	1,59
Coef. Variação	11%	1%	7%	7%	11%	Ganho massa total
Mediana	123,4	86,4	13,6	17,6	39%	3661,6
Variância	259,6	0,9	0,9	1,0	0%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	7,5	0,5	0,5	0,7	0,0	0,25

Biometria - Grupo 3 NR / 60 dias						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
0001E0324C	291,3	87,2	12,8	21,31	46%	Número de peixes
0001C54135	271,9	86,9	13,1	22,45	43%	24
000137E369	179,3	87,0	13,0	18,44	28%	Taxa sobrevivência
0001FAC346	167,7	86,8	13,2	19,15	27%	100
0001231ABA	187,2	84,2	15,8	18,73	30%	duração
0001E08686	252,3	87,9	12,1	20,78	40%	31
0001E02922	203,7	85,8	14,2	19,10	32%	ração ofertada
0001BFBAC9	198,5	86,8	13,2	18,80	32%	173,6
Média	201,9	86,3	13,7	19,3	32,0%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	31,39	1,40	1,40	0,84	5,0%	1,74
Coef. Variação	16%	2%	10%	4%	16%	Ganho massa total
Mediana	201,1	86,9	13,1	19,1	32%	3085,0
Variância	1876,0	1,1	1,1	1,9	0%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	17,8	0,8	0,8	0,5	0,0	0,23

Apêndice D – Biometria do grupo NP, no dia 30 e 60

Biometria - Grupo 7 NP - dia 30						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
0001448A7C	69,0	84,8	15,2	17,07	22%	Número de peixes
000125F6E3	97,8	87,2	12,8	16,98	31%	32
000124CB81	121,9	87,3	12,7	17,13	38%	Taxa sobrevivência
000125D250	106,3	87,5	12,5	15,68	33%	100
000140F9AF	83,3	88,6	11,4	16,90	26%	duração
0001FB8E82	117,4	86,6	13,4	18,07	37%	32
0001E0651B	93,3	87,3	12,7	17,20	29%	ração ofertada
0001230D0F	141,1	86,7	13,3	17,85	44%	193,7
Média	108,3	87,3	12,7	17,1	33,8%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	22,43	0,80	0,80	0,94	7,0%	1,63
Coef. Variação	21%	1%	6%	6%	21%	Ganho massa total
Mediana	102,05	87,2	12,8	17,1	32%	3801,0
Variância	461,0	1,0	1,0	0,4	0%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	12,7	0,4	0,4	0,5	0,0	0,25

Biometria - Grupo 7 NP - dia 60						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
000126A881	286,5	86,7	13,3	20,43	45%	Número de peixes
0001BF6EB6	248,4	86,1	13,9	19,31	39%	24
0001BFBBFE	214,5	87,0	13,0	20,03	34%	Taxa sobrevivência
000121C75D	176,0	87,5	12,5	18,12	28%	100
0001E063EC	233,9	86,1	13,9	19,83	37%	duração
0001BFADFF	209,1	84,9	15,1	19,43	33%	31
00012635BF	271,5	87,3	12,7	18,88	43%	ração ofertada
000125CFE7	303,5	87,8	12,2	21,49	48%	189
Média	238,8	86,7	13,3	19,5	37,9%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	50,26	1,20	1,20	1,26	8,0%	1,82
Coef. Variação	21%	1%	9%	6%	21%	Ganho massa total
Mediana	241,15	86,8	13,2	19,6	38%	3216,8
Variância	1615,9	0,8	0,8	0,9	0%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	28,4	0,7	0,7	0,7	0,0	0,22

Apêndice E – Biometria do grupo ER, no dia 30 e 60

Biometria - Grupo 4 ER - dia 30						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
0001448A7C	100,9	87,4	12,6	16,05	32%	Número de peixes
000125F6E3	123,0	86,4	13,6	16,47	38%	32
000124CB81	147,3	84,7	15,3	19,40	46%	Taxa sobrevivência
000125D250	83,5	86,8	13,2	15,74	26%	100
000140F9AF	92,1	84,3	15,7	16,53	29%	duração
0001FB8E82	97,2	87,1	12,9	16,56	30%	32
0001E0651B	126,9	87,7	12,3	16,85	40%	ração ofertada
0001230D0F	94,3	86,2	13,8	15,87	29%	194,1
Média	98,8	86,4	13,6	16,3	30,9%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	16,52	1,29	1,29	0,48	5,2%	1,92
Coef. Variação	17%	1%	10%	3%	17%	Ganho massa total
Mediana	99,05	86,6	13,4	16,5	31%	3235,1
Variância	416,8	1,3	1,3	1,2	0%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	9,3	0,7	0,7	0,3	0,0	0,21

Biometria - Grupo 4 ER - dia 60						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
000126A881	221,8	85,8	14,2	18,92	35%	Número de peixes
0001BF6EB6	266,9	86,1	13,9	21,62	42%	24
0001BFB8FE	270,2	87,2	12,8	20,88	43%	Taxa sobrevivência
000121C75D	119,7	87,0	13,0	16,34	19%	100
0001E063EC	264,9	88,7	11,3	21,04	42%	duração
0001BFADFF	246,6	91,0	9,0	20,08	39%	31
00012635BF	143,7	84,6	15,4	16,41	23%	ração ofertada
000125CFE7	235,1	86,5	13,5	19,50	37%	174
Média	202,0	87,5	12,5	18,7	32,1%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	65,60	2,41	2,41	2,17	10,4%	1,62
Coef. Variação	32%	3%	19%	12%	32%	Ganho massa total
Mediana	240,85	86,7	13,3	19,8	38%	3321,8
Variância	2943,3	3,4	3,4	3,6	1%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	37,1	1,4	1,4	1,2	0,1	0,25

Apêndice F – Biometria do grupo EP, no dia 30 e 60

Biometria - Grupo 4 ER - dia 30						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
0001448A7C	83,0	85,7	14,3	17,80	26%	Número de peixes
000125F6E3	-15,1	89,1	10,9	13,48	-5%	32
000124CB81	74,3	88,0	12,0	16,23	23%	Taxa sobrevivência
000125D250	102,7	86,0	14,0	18,10	32%	100
000140F9AF	112,8	86,6	13,4	16,84	35%	duração
0001FB8E82	139,9	85,5	14,5	18,71	44%	32
0001E0651B	119,5	89,4	10,6	17,87	37%	ração ofertada
0001230D0F	95,1	82,3	17,7	16,45	30%	192,6
Média	114,0	85,9	14,1	17,6	35,6%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	17,23	2,53	2,53	0,93	5,4%	2,01
Coef. Variação	15%	3%	18%	5%	15%	Ganho massa total
Mediana	98,9	86,3	13,7	17,3	31%	3059,6
Variância	1925,2	4,6	4,6	2,4	2%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	9,7	1,4	1,4	0,5	0,0	0,20

Biometria - Grupo 4 ER - dia 60						
TAG	Ganho de Massa	Rend. Carcaça	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tx. Cresc. Específ.	Dados Complem.
000126A881	163,1	85,6	14,4	18,06	26%	Número de peixes
0001BF6EB6	263,5	85,4	14,6	20,70	42%	24
0001BFBBFE	193,5	87,5	12,5	17,64	31%	Taxa sobrevivência
000121C75D	209,2	85,3	14,7	19,65	33%	100
0001E063EC	261,7	88,0	12,0	21,04	42%	duração
0001BFADFF	204,7	84,0	16,0	18,84	32%	31
00012635BF	185,6	87,8	12,2	18,11	29%	ração ofertada
000125CFE7	146,7	86,3	13,7	17,59	23%	178,5
Média	201,6	86,3	13,7	19,0	32,0%	Conv. Alimentar
Desvio Padrão	41,68	1,68	1,68	1,36	6,6%	1,86
Coef. Variação	21%	2%	12%	7%	21%	Ganho massa total
Mediana	199,1	85,9	14,1	18,5	32%	2977,3
Variância	1537,5	1,8	1,8	1,6	0%	Tx. Efic. Protéica
Intervalo	23,6	0,9	0,9	0,8	0,0	0,22

Apêndice G– Eritrograma e Leucograma dos grupos aos 30 dias de experimento

Grupo 3NR / 4ER / 7NP / 8EP DIA 0 E DIA 30																				
TAG	Eritróctos	MÉDIA ER	Hematócrito	MÉDIA HT	Hemoglobina	MÉDIA HB	VCM	HCM	CHCM	Leucócitos totais	Linfócitos	Lc. abs.	Neutrófilos	Neu. Abs.	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos			
DIA 0 / 0001BF8345	1,07	1,08	47	47	8,69	8,69	437,89	81,75	18,49	18.776,00	95,33	17.899,16	3,66	687,20	1	187,76	0			
DIA 0 / 0001E05D12	0,90	0,93	50	49	49,5	8,37	545,79	93,47	16,91	18.811,30	93,66	17.618,66	4,33	814,53	2	376,23	0			
DIA 0 / 000126378D	1,12	1,18	45	44	44,5	8,20	391,81	73,80	18,43	23.894,80	86	20.549,53	10	2.389,48	4	955,79	0			
DIA 0 / 0001C948C6	1,00	1,05	52	52,5	9,52	9,52	514,75	95,73	18,22	17.039,00	93,66	15.958,73	4,33	737,79	2	340,78	0			
DIA 0 / 0001E06472	0,82	0,84	53	53	52,75	8,00	637,10	97,98	15,17	15.420,34	87,7	13.518,40	8,7	1.336,33	3,3	513,96	0			
DIA 0 / 0001269585	1,04	0,90	49	49	49,10	10,10	493,29	97,57	20,61	17.628,10	88	15.512,73	10,33	1.820,98	1,66	292,63	0			
DIA 0 / 0001BF904A	1,11	1,15	51,5	51,5	8,53	8,53	458,46	77,42	16,56	20.023,90	83,33	16.685,92	11,66	2.334,79	5	1.001,20	0			
DIA 0 / 0001C91E94	0,90	0,97	48	48	48,67	8,67	519,86	96,82	18,06	18.672,00	90,5	16.898,16	7	1.307,04	2,5	466,80	0			
DIA 0 / 0001BF8D98	1,12	1,12	49,7	49,7	9,11	9,11	443,75	81,90	18,33	14.239,40	90,33	12.862,45	5,66	805,95	3,66	521,16	0			
DIA 0 / 0001452F07	1,23	1,10	50	49	49,5	8,82	418,54	72,26	17,82	20.205,60	91,33	18.453,77	5,66	1.143,64	3	606,17	0			
DIA 0 / 0001F887A2	1,21	1,27	52,5	52,5	9,54	9,54	426,83	79,48	18,17	18.869,60	89,66	16.918,48	7	1.320,87	3,33	628,36	0			
DIA 0 / 1238260	0,97	0,83	49,7	49,7	8,67	8,67	538,27	89,80	17,44	15.496,70	87	13.482,13	10,5	1.627,15	2,5	387,42	0			
NR / 0001D38A51	1,11	0,96	1.035	47,5	48	47,75	9,25	9,485	449,69	91,6	19,9	20.092,10	93	18.685,65	5	1.004,61	2	401,84	0	
NR / 000126844E	1,13	1,01	56	57	56,5	10,23	9,07	516,82	90,2	17,1	18.850,90	92	17.342,83	5	942,55	3	565,53	0		
NR / 0001BF8687	1,02	1,31	1.165	47,5	47	47,25	10,09	10,05	423,88	86,4	21,3	26.999,50	97,3	26.270,51	2	539,99	0,66	178,20	0	
NR / 0001E066C2	1,42	1,55	1.485	53,5	54	53,75	10,92	11,1	11,01	366,74	74,1	20,5	34.967,40	95,66	33.449,81	2,66	930,13	1,66	580,46	0
NR / 0001E039F6	1,27	1,3	1.285	51,5	51	51,25	10,2	9,47	9.835	401,04	76,5	19,2	22.814,00	95	21.673,30	3,66	834,99	1,33	303,43	0
NR / 0001CAG6EE	0,89	0,86	0.875	46,5	47	46,75	9,11	9,11	530,30	104,1	19,5	14.334,30	95,33	13.664,89	3	430,03	1,66	237,95	0	
NR / 000125D8E3	1,42	1,42	1.42	53	53	9,54	9,87	9,705	373,24	68,3	18,3	32.272,70	93	30.013,61	5	1.613,64	2	645,45	0	
NR / 00012351C1	1,19	1,12	1.155	53	53	9,83	10,7	10,265	454,29	88,9	19,4	23.760,00	94,66	22.491,22	3	712,80	2,33	553,61	0	
ER / 0001448A7C	1,14	0,99	1.07	57	57	10,99	11,03	11,01	522,9	103,4	19,3	23.163,40	92,33	21.386,77	4	926,54	3,66	847,78	0	
ER / 000125F6E3	1,08	1,01	1.05	60	59	59,5	11,03	11,03	564,7	105,6	18,5	21.640,90	92	19.909,63	5	1.082,05	3	649,23	0	
ER / 000124CB81	0,81	0,94	0.88	51,5	52	51,75	9,3	9,4	9.35	605,5	106,9	18,1	16.081,50	95	15.277,43	1	160,82	4	643,26	0
ER / 000125D250	0,95	0,94	0.95	58	58	10,27	10,09	10,18	612,7	107,7	17,6	17.140,80	95,3	16.335,18	1,66	284,54	3	514,22	0	
ER / 000140F9AF	1,26	1,04	1,15	58	58	10,92	11,2	11,06	488,8	96,2	19,1	23.296,50	94	21.898,71	2	465,93	4	931,86	0	
ER / 0001FB8E82	0,97	1,08	1,13	46,5	46,5	46,5	10,2	9,32	9,76	461,9	95,2	21,0	17.012,40	93,66	15.933,81	4	680,50	2,33	396,39	0
ER / 0001E0651B	1,20	1,08	1,14	55,5	55,5	55,5	11,1	12,5	478,4	103,5	21,3	27.846,50	91,33	25.432,21	3	835,40	5,66	1.576,11	0	
ER / 000123000F	1,18	1,29	1,24	58	59	58,5	11,54	10,78	11,16	479,5	90,4	19,1	29.314,30	93	27.262,30	2,33	683,02	4,66	1.366,05	0
NP / 0001E05FFE	1,2	1,38	1,29	48	48,5	48,25	8,31	8,45	382,3	65,0	17,4	19.364,20	94,66	18.330,15	1,66	321,45	3,66	708,73	0	
NP / 00012682C2	1,17	1,26	1,215	51	51,5	51,25	9,61	9,8	9.705	426,4	79,9	18,9	23.117,20	92	21.267,82	3	693,52	5	1.155,86	0
NP / 0001382AB0	1,33	0,93	1,13	55	55	55	9,87	9,94	9.905	459,6	87,7	18,0	26.447,90	92	24.332,07	1	264,48	7	1.851,35	0
NP / 000125C21E	1,21	1,2	1,205	53	52	52,5	9,9	9,51	9.705	436,5	80,5	18,5	18.461,00	93,33	17.229,65	3	553,83	3,66	675,67	0
NP / 000125D358	1,23	1,35	1,29	47	47	47,69	9,61	9,65	370,1	74,8	20,5	22.821,20	93,33	21.299,03	3,33	759,95	3,33	759,95	0	
NP / 00012F41C8	0,96	0,81	0.885	49	49	49,9	9,54	9,54	538,5	107,8	19,5	19.346,50	96	18.572,64	0,33	63,84	3,66	708,08	0	
NP / 0001410D2E	1,34	1,26	1,3	60	59	59,5	10,81	10,78	10,795	454,3	83,0	18,1	23.041,90	94,66	21.811,46	0,33	76,04	5	1.152,10	0
NP / 0001236FE5	1,26	1,09	1,175	59	58	58,5	11,36	11,36	487,5	96,7	19,4	24.314,90	94,33	22.936,25	1,66	403,63	4	972,60	0	
EP / 000124BD57	1,16	1,15	1,155	48	48	48	8,92	8,92	415,0	77,2	18,6	29.892,90	95,66	28.595,55	2	597,86	2,33	696,50	0	
EP / 000126A654	1,44	1,29	1,365	49	49	49	10,3	9,4	9.85	352,5	72,2	20,1	24.745,20	97,66	24.166,16	0,66	163,32	1,66	410,77	0
EP / 0001BE8D97	1,13	1,02	1,075	51	51	51	10,16	10,09	10,125	466,5	94,2	19,9	22.599,10	94,33	21.317,73	3	677,97	2,66	601,14	0
EP / 0001FD4D87	1,3	1,29	1,295	59	59	59	11,14	11,97	11,555	455,0	89,2	19,6	23.550,70	95	22.373,17	1,66	390,94	3,33	784,24	0
EP / 00012AE898	1,21	1,29	1,25	50	50	50	9,36	10,27	9,815	404,3	78,5	19,6	20.999,10	94	19.739,15	2	419,98	4	839,96	0
EP / 0001BF62AE	1,21	1,27	1,24	51,5	51,5	51,5	10,41	10,41	10,41	418,7	84,0	20,2	23.195,90	94,33	21.880,69	2,33	540,46	3,33	772,42	0
EP / 00012C9B43	1,41	1,49	1,45	45,5	45,5	45,5	10,41	9,61	10,01	316,7	69,0	22,0	25.931,40	96	24.894,14	2,33	604,20	1,66	430,46	0
EP / 0001E0869D	1,36	1,11	1,235	56	56	56	11,36	11,18	11,27	438,6	91,3	20,1	23.750,00	94	22.325,00	1,66	394,25	4,33	1.028,38	0

Apêndice H – Eritrograma e Leucograma dos grupos aos 60 dias de experimento

TAG		Grupo 3 NR / 4 ER / 7 NP / 8 EP DIA 0 E DIA 60															Eosinófilos			
Eritrócitos		MÉDIA ER	Hematócrito	MÉDIA HT	Hemoglobina	MÉDIA HB	VCM	HCM	CHCM	Leucócitos totais	Linfócitos	Lc. abs.	Neutrófilos	Neu. Abs.	Monócitos	Mon. Abs.	Basófilos			
DIA 0		1,07	1,08	1,08	8,69	8,69	8,69	81,75	18,49	18,776,00	95,33	17,899,16	3,66	687,20	1,00	187,76	0			
DIA 0		0,90	0,93	0,92	49,5	8,37	8,37	93,47	16,91	18,811,30	93,66	17,618,66	4,33	814,53	2,00	376,23	0			
DIA 0		1,12	1,18	1,15	45	8,20	8,20	93,80	18,43	23,894,80	86	20,549,53	10,00	2,389,48	4,00	955,79	0			
DIA 0		1,00	1,05	1,03	52,5	9,52	9,52	95,73	18,22	17,039,00	93,66	15,958,73	4,33	737,79	2,00	340,78	0			
DIA 0		0,82	0,84	0,83	52,5	8,00	8,00	97,98	15,17	15,420,34	87,7	13,518,40	8,67	1,336,33	3,33	513,96	0			
DIA 0		1,04	0,90	0,97	49	10,10	10,10	93,29	20,61	17,628,10	88	15,512,73	10,33	1,820,98	1,66	292,63	0			
DIA 0		1,11	1,15	1,13	51,5	8,53	8,53	97,42	16,56	20,023,90	83,33	16,685,92	11,66	2,334,79	5,00	1,001,20	0			
DIA 0		0,90	0,97	0,94	48	8,67	8,67	96,82	18,06	18,672,00	90,5	16,898,16	7,00	1,307,04	2,50	466,80	0			
DIA 0		1,12	1,12	1,12	49,7	9,11	9,11	91,90	18,33	14,239,40	90,33	12,862,45	5,66	805,95	3,66	521,16	0			
DIA 0		1,23	1,10	1,17	50	8,82	8,82	92,28	17,82	20,205,60	91,33	18,453,77	5,66	1,143,64	3,00	606,17	0			
DIA 0		1,21	1,27	1,24	52,5	9,54	9,54	95,48	18,17	18,869,60	89,66	16,918,48	7,00	1,320,87	3,33	628,36	0			
DIA 0		0,97	0,83	0,90	49,7	8,67	8,67	98,80	17,44	15,496,70	87	13,482,13	10,50	1,627,15	2,50	387,42	0			
NR 0001E0324C		0,82	0,91	0,865	52	53	10,93	123,0	20,3	17,653,10	79	13,945,95	15,50	2,736,23	5,50	970,92	0			
NR 0001C54135		0,91	0,92	0,915	60	60	12,74	120,2	20,6	18,787,50	89,66	16,844,87	8,33	1,565,00	2,00	375,75	0			
NR 000137E369		1,03	1,21	1,12	55	55	9,98	100,2	18,2	22,957,50	97	22,268,78	1,66	381,09	1,33	305,33	0			
NR 0001JFAC346		0,9	0,97	0,935	55	55	10,96	108,5	19,8	24,024,60	95,66	22,981,93	3,00	720,74	1,33	319,53	0			
NR 0001231ABA		1,17	1,22	1,195	47,5	47,5	9,40	90,8	19,4	35,589,90	90,33	32,148,36	7,00	2,491,29	2,66	946,69	0			
NR 0001E08686		1,26	1,11	1,185	59	59	11,14	98,4	17,8	38,758,70	98	37,983,53	0,33	127,90	1,66	643,39	0			
NR 0001E02922		0,92	1,02	0,97	55	54,5	54,75	10,38	10,13	28,932,50	95	27,485,88	2,33	674,13	2,66	769,60	0			
NR 0001BFBAC9		0,75	0,82	0,785	54,5	54,5	9,55	9,62	17,6	19,125,60	96,66	18,486,80	1,00	191,26	2,33	445,63	0			
ER 000126A881		0,91	1,05	0,98	48	48	10,02	91,8	20,0	26,352,10	92,33	24,330,89	4,00	1,054,08	3,66	964,49	0			
ER 0001BFBEB6		1,05	0,96	1,01	52	52	10,06	99,3	19,2	28,158,40	92	25,905,73	5,00	1,407,92	3,00	844,75	0			
ER 0001BFB8FE		1,12	1,34	1,23	53	53	9,80	98,4	18,5	27,118,10	95	25,762,20	1,00	271,18	4,00	1,084,72	0			
ER 000121C75D		1,06	1,21	1,14	49	49	10,45	96,2	20,5	23,827,40	95,33	22,714,66	1,66	395,53	3,00	714,82	0			
ER 0001E063EC		0,88	1,00	0,94	56	56	9,58	96,6	17,2	17,950,60	93	16,694,06	3,00	538,52	4,00	718,02	0			
ER 0001BFA0FF		0,88	0,81	0,85	55	55	9,98	95,1	17,7	19,565,80	93,33	18,260,76	4,00	782,63	2,66	520,45	0			
ER 00012635BF		0,92	1,00	0,96	55	54	9,84	95,5	17,8	11,661,80	91,33	10,650,72	3,00	349,85	5,66	600,06	0			
ER 000125CFE7		1,45	1,15	1,30	62	62	11,65	105,6	17,9	31,451,60	93	29,249,99	2,33	732,82	4,66	1,465,64	0			
NP 000137CE48		1,33	1,11	1,22	57	57	10,38	100,2	17,9	22,770,10	94,66	21,554,18	1,66	377,98	3,66	833,39	0			
NP 0001422A86		1,06	1,15	1,105	63	63	10,06	102,4	16,1	16,485,50	92	15,166,66	3,00	494,57	5,00	824,28	0			
NP 000125D840		0,78	0,85	0,815	50	50	8,86	86,0	17,5	12,595,40	92	11,387,77	1,00	125,95	7,00	881,68	0			
NP 000121E13D		1,21	1,12	1,165	54	54	10,06	102,4	18,8	22,722,70	93,33	21,207,10	3,00	681,68	3,66	831,65	0			
NP 000125F9BC		1,09	1,01	1,05	54	53	9,51	93,3	17,6	19,965,90	93,33	18,634,17	3,33	664,86	3,33	664,86	0			
NP 0001E03655		1,11	0,95	1,03	48	48	8,78	90,4	18,6	18,558,50	95,66	17,755,06	1,00	185,59	3,33	618,00	0			
NP 0001E0313B		1,21	1,21	1,21	52	53	9,95	96,9	18,7	21,801,80	93,66	20,419,57	1,33	289,96	5,00	1,090,09	0			
NP 00012F2918		0,87	0,84	0,855	62,5	63	10,56	115,8	17,6	16,218,40	94	15,245,30	2,00	324,37	4,00	648,74	0			
EP 0001C91DC3		1,13	1,19	1,16	60	59,5	10,45	102,7	17,3	17,965,70	84	15,091,19	9,33	1,676,20	6,66	1,196,52	0			
EP 0001449A9D		1,13	1,08	1,105	62,5	62	11,40	118,0	18,6	20,065,70	92,33	18,526,66	4,66	935,06	3,00	601,97	0			
EP 000125D228		1,11	0,88	0,995	54	54	9,18	93,7	17,2	23,934,40	88	20,583,58	10,00	2,393,44	4,00	957,38	0			
EP 0001BFB6E07		1,28	1,07	1,175	53,4	54	9,47	95,8	17,7	19,707,60	92	18,130,99	3,33	656,26	4,66	918,37	0			
EP 0001BFB603		0,93	1,29	1,11	52	51,5	8,82	88,2	17,0	19,088,60	93,33	17,815,39	3,66	698,64	3,00	572,66	0			
EP 0001DFBE29		1,05	1,02	1,035	50,5	50,5	8,75	84,5	17,3	17,798,80	93,33	16,611,62	4,33	770,69	2,33	414,71	0			
EP 0001E064C0		1,36	1,52	1,44	56,5	57	9,98	99,8	17,6	24,406,80	80,66	19,686,52	14,66	3,578,04	4,66	1,137,36	0			
EP 0001C33B08		0,72	0,78	0,75	53	53	10,20	98,4	18,9	11,241,20	93,66	10,528,51	4,33	486,74	2,00	224,82	0			

Apêndice H – índices biométricos, Glicose e Cortisol aos 30 e aos 60 dias de experimento

Grupo 3 NR / 4 ER / 7 NP / 8 EP									
COLETA	TAG	Mas. das Visceras	Rend. Carcaca	Índ. Visceros.	Fat. Cond. Corp.	Tax. De Cresc. Esp.	Cortisol	Glicose	
DIA 0 - CONTROLE	Dia 0	00018FB345	54,4	85,93	14,07	15,05	-	1,84	-
	Dia 0	0001E05D12	52,5	85,72	14,28	14,03	-	1,45	-
	Dia 0	000126378D	61,1	86,05	13,95	16,23	-	1,33	-
	Dia 0	0001C948C6	65,7	84,28	15,72	16,07	-	2,97	-
	Dia 0	0001E06472	56,4	85,91	14,09	14,88	-	5,64	134,65
	Dia 0	00012695B5	65,7	83,88	16,12	15,32	-	3,33	149,98
	Dia 0	00018E904A	46,5	87,13	12,87	13,58	-	7,31	132,16
	Dia 0	0001C91E94	62,6	85,40	14,60	16,37	-	3,42	110,20
	Dia 0	00018FBD98	53,0	86,70	13,30	14,93	-	4,34	176,34
	Dia 0	0001452FD7	62,8	85,16	14,84	15,56	-	7,31	115,81
	Dia 0	0001FB87A2	58,1	84,91	15,09	14,93	-	7,31	143,83
	Dia 0	1238260	50,2	86,14	13,86	13,27	-	4,49	123,76
DIA 30	Dia 30-NR	0001D38A51	76,5	85,22	14,78	17,25	38%	1,63	114,30
	Dia 30-NR	000126B44E	89,1	84,60	15,40	18,90	49%	1,06	94,14
	Dia 30-NR	00018FB687	73,7	86,47	13,53	17,98	35%	1,09	109,64
	Dia 30-NR	0001E066C2	71,3	86,96	13,04	17,52	35%	4,25	149,65
	Dia 30-NR	0001E039F6	73,5	86,40	13,60	17,78	40%	5,03	55,29
	Dia 30-NR	0001CA6FEE	59,7	87,60	12,40	16,04	32%	4,65	94,43
	Dia 30-NR	000125D8E3	87,2	85,16	14,84	18,89	43%	5,82	100,74
	Dia 30-NR	00012351C1	66,9	86,45	13,55	16,35	39%	4,56	95,69
	Dia 30-ER	0001448A7C	60,8	87,37	12,63	16,05	32%	6,77	89,55
	Dia 30-ER	000125F6E3	66,3	86,35	13,65	16,47	38%	7,41	143,45
	Dia 30-ER	000124CB81	92,5	84,67	15,33	19,40	46%	4,35	75,79
	Dia 30-ER	000125D250	61,1	86,84	13,16	15,74	26%	2,97	60,21
	Dia 30-ER	000140F9AF	76,6	84,34	15,66	16,53	29%	8,59	116,45
	Dia 30-ER	0001FB8E82	64,8	87,13	12,87	16,56	30%	7,04	136,42
	Dia 30-ER	0001E0651B	64,3	87,69	12,31	16,85	40%	8,55	74,31
	Dia 30-ER	0001230D0F	67,0	86,15	13,85	15,87	29%	4,36	108,64
	Dia 30-NP	0001E05FFE	76,9	84,78	15,22	17,07	22%	9,87	134,69
	Dia 30-NP	000126B2C2	63,1	87,19	12,81	16,98	31%	1,83	63,51
	Dia 30-NP	0001382AB0	67,7	87,29	12,71	17,13	38%	4,08	124,86
	Dia 30-NP	000125C21E	57,2	87,51	12,49	15,68	33%	3,40	120,97
	Dia 30-NP	000125D35B	56,9	88,59	11,41	16,90	26%	5,80	118,90
	Dia 30-NP	00012F41C8	72,4	86,60	13,40	18,07	37%	6,38	109,42
	Dia 30-NP	0001410D2E	67,7	87,30	12,70	17,20	29%	3,46	106,56
	Dia 30-NP	0001236FE5	73,3	86,71	13,29	17,85	44%	1,82	104,43
	Dia 30-EP	000124BD57	74,9	85,74	14,26	17,80	26%	5,89	138,42
	Dia 30-EP	000126A654	41,0	89,13	10,87	13,48	-5%	3,96	98,00
	Dia 30-EP	00018E8D97	57,2	87,97	12,03	16,23	23%	9,05	108,04
	Dia 30-EP	0001FBD487	73,1	85,98	14,02	18,10	32%	4,06	128,86
	Dia 30-EP	00012AE89B	64,5	86,56	13,44	16,84	35%	8,31	126,16
	Dia 30-EP	00018F62AE	84,3	85,47	14,53	18,71	44%	8,31	109,48
	Dia 30-EP	00012C5B43	58,3	89,37	10,63	17,87	37%	8,31	89,58
	Dia 30-EP	0001E0869D	87,6	82,30	17,70	16,45	30%	8,31	105,43
DIA 60	Dia 60-NR	0001E0324C	89,8	87,23	12,77	21,31	46%	3,72	95,32
	Dia 60-NR	0001C54135	93,4	86,92	13,08	22,45	43%	1,86	84,61
	Dia 60-NR	000137E369	73,3	86,96	13,04	18,44	28%	0,69	96,68
	Dia 60-NR	0001FAC346	77,4	86,79	13,21	19,15	27%	6,84	96,13
	Dia 60-NR	0001231ABA	93,9	84,18	15,82	18,73	30%	3,46	86,82
	Dia 60-NR	0001E08686	79,0	87,93	12,07	20,78	40%	3,66	109,57
	Dia 60-NR	0001E02922	84,7	85,83	14,17	19,10	32%	4,82	115,75
	Dia 60-NR	00018FBAC9	75,7	86,80	13,20	18,80	32%	5,85	92,01
	Dia 60-ER	000126A881	82,4	85,77	14,23	18,92	35%	1,28	103,92
	Dia 60-ER	00018F6EB6	95,7	86,08	13,92	21,62	42%	4,94	79,90
	Dia 60-ER	00018FB8FE	87,0	87,22	12,78	20,88	43%	2,42	64,05
	Dia 60-ER	000121C75D	65,8	87,01	12,99	16,34	19%	3,54	62,43
	Dia 60-ER	0001E063EC	81,1	88,66	11,34	21,04	42%	5,37	99,60
	Dia 60-ER	00018FADFF	56,4	91,00	9,00	20,08	39%	3,02	57,38
	Dia 60-ER	00012635BF	78,8	84,61	15,39	16,41	23%	8,38	104,09
	Dia 60-ER	000125CFE7	83,2	86,46	13,54	19,50	37%	4,54	89,14
	Dia 60-NP	000137CE48	87,2	86,66	13,34	20,43	45%	1,86	121,71
	Dia 60-NP	0001422A86	87,2	86,15	13,85	19,31	39%	4,28	91,38
	Dia 60-NP	000125D840	79,0	86,99	13,01	20,03	34%	3,72	87,63
	Dia 60-NP	000121E13D	71,4	87,49	12,51	18,12	28%	0,53	71,57
	Dia 60-NP	000125F9BC	87,9	86,15	13,85	19,83	37%	5,20	110,64
	Dia 60-NP	0001E03655	93,8	84,91	15,09	19,43	33%	3,53	106,15
	Dia 60-NP	0001E0313B	77,3	87,33	12,67	18,88	43%	7,79	108,32
	Dia 60-NP	00012F2918	84,1	87,81	12,19	21,49	48%	2,99	92,01
	Dia 60-EP	0001C91DC3	80,9	85,55	14,45	18,06	26%	7,37	85,87
	Dia 60-EP	0001449A9D	96,5	85,43	14,57	20,70	42%	3,89	54,55
	Dia 60-EP	000125D228	68,1	87,54	12,46	17,64	31%	3,93	66,66
	Dia 60-EP	00018F6E07	93,7	85,32	14,68	19,65	33%	3,81	66,35
	Dia 60-EP	00018FB603	83,5	87,98	12,02	21,04	42%	4,84	83,37
	Dia 60-EP	0001DFBE29	93,8	84,04	15,96	18,84	32%	3,86	95,53
	Dia 60-EP	0001E064C0	70,0	87,84	12,16	18,11	29%	4,90	150,30
	Dia 60-EP	0001C33BDB	70,0	86,32	13,68	17,59	23%	4,94	54,23

Apêndice I – Aferições da água dos tanques e da água de abastecimento

DIA DA AFERIÇÃO	OXIGÊNIO DISSOLVIDO (em mg/L)												ÁGUA do abastecimento	
	caixa 3 NR			caixa 4 ER			caixa 7 NP			caixa 8 EP			oxigênio	temperatura °C.
	saída	entrada	consumido	saída	entrada	consumido	saída	entrada	consumido	saída	entrada	consumido		
4/out	5,20	5,31	0,11	5,02	5,08	0,06	5,03	5,17	0,14	5,11	5,42	0,31	7,00	14,60
8/out	5,27	6,12	0,85	5,21	5,70	0,49	5,49	5,51	0,02	5,69	5,90	0,21	7,72	12,50
11/out	5,20	6,04	0,84	5,45	6,40	0,95	5,56	6,25	0,69	5,57	6,10	0,53	8,46	11,80
17/out	4,77	5,20	0,43	4,38	5,10	0,72	3,89	4,01	0,12	4,47	5,05	0,58	7,05	14,80
25/out	4,08	4,54	0,46	3,76	4,74	0,98	3,91	4,50	0,59	3,84	4,33	0,49	7,15	17,00
1/nov	4,08	4,48	0,40	4,27	5,08	0,81	4,16	4,81	0,65	4,04	4,89	0,85	7,02	16,80
8/nov	5,43	5,77	0,34	4,55	5,34	0,79	4,94	5,78	0,84	5,11	5,91	0,80	7,44	15,20
12/nov	4,63	5,01	0,38	4,61	5,40	0,79	4,66	4,87	0,21	4,38	4,92	0,54	7,18	16,60
15/nov	5,40	6,02	0,62	5,12	5,76	0,64	5,47	5,88	0,41	5,16	5,81	0,65	7,66	13,50
19/nov	5,23	5,50	0,27	4,81	5,49	0,68	5,00	5,35	0,35	4,80	5,20	0,40	7,27	16,10
20/nov	4,98	5,63	0,65	5,03	5,53	0,50	5,04	5,50	0,46	4,75	5,33	0,58	7,33	15,50
22/nov	4,72	4,83	0,11	4,72	5,27	0,55	4,88	5,19	0,31	4,43	4,73	0,30	7,08	16,20
30/nov	4,76	5,19	0,43	4,99	5,63	0,64	4,82	5,20	0,38	4,70	5,35	0,65	7,23	15,90
2/dez	5,01	5,30	0,29	4,90	5,81	0,91	4,98	5,25	0,27	4,75	5,60	0,85	7,31	15,90
7/dez	4,81	5,36	0,55	4,87	5,69	0,82	4,94	5,37	0,43	4,75	5,36	0,61	7,55	14,80
MÉDIA	4,90	5,35	0,45	4,78	5,47	0,69	4,85	5,24	0,39	4,77	5,33	0,56	7,36	15,15
DESVIO	0,42	0,51	0,22	0,42	0,40	0,23	0,52	0,55	0,23	0,51	0,49	0,19	0,38	1,54

Apêndice J – Viabilidade do probiótico na ração

DIA	Contagem de colônias (µg/dL)			média	desvio
7	4,22E+08	3,55E+08	3,90E+08	3,89E+08	3,35E+07
15	4,20E+08	3,00E+08	4,21E+08	3,80E+08	6,96E+07
30	3,15E+08	3,10E+08	4,20E+08	3,48E+08	6,21E+07
45	3,20E+08	3,01E+08	3,96E+08	3,39E+08	5,03E+07
60	2,41E+08	3,98E+08	3,99E+08	3,46E+08	9,09E+07
120	2,25E+08	3,96E+08	2,20E+08	2,80E+08	1,00E+08

Curva de crescimento