



ARTIGO | ARTICLE

## Probiótico na alimentação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), durante a inversão sexual: desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal

*Probiotic in the feed of Nile tilapia (Oreochromis niloticus Linnaeus, 1758) during sex reversal: zootechnical performance and the recovery of probiotic bacteria in the intestine*

Leonardo Tachibana<sup>1</sup>  
Danielle Carla Dias<sup>2</sup>  
Carlos Massatoshi Ishikawa<sup>1</sup>  
Camila Fernandes Corrêa<sup>3</sup>  
Antônio Fernando Gervásio Leonardo<sup>3</sup>  
Maria José Tavares Ranzani-Paiva<sup>1</sup>

### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o desempenho zootécnico de tilápia-do-Nilo, na fase de inversão sexual, com a utilização do probiótico *Bacillus subtilis* na dieta e confirmar a presença deste probiótico no intestino. Foram utilizadas 1 350 pós-larvas estocadas em 18 aquários retangulares, com 15L de água na densidade de 5 peixes.L<sup>-1</sup>, com peso médio inicial de 16,0, DP=5,2mg e comprimento total de M=9,6, DP=9,1mm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (controle, 5 e 10g.kg<sup>-1</sup> ração) e seis repetições, sendo o período experimental de trinta dias. Seis animais por tratamento foram encaminhados para análise microbiológica, eutanasiados e descontaminados externamente com álcool 70%. Os intestinos foram retirados e

<sup>1</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Pesca. Av. Francisco Matarazzo, 455, 05001-900, São Paulo, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: L. TACHIBANA. E-mail: <leotachibana@apta.sp.gov.br>.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura. Jaboticabal, SP Brasil.

<sup>3</sup> Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Registro, SP, Brasil.

macerados em tubos de ensaio esterilizados, feitas diluições seriadas até  $10^{-2}$  e, semeadas em placas contendo meio *Tryptic Soy Agar*. Os parâmetros de desempenho zootécnico não foram afetados pela inclusão do probiótico na dieta. Nos peixes do tratamento controle, não se detectou o crescimento de *B. subtilis*, demonstrando que não houve contaminação dos aquários e da ração do tratamento controle. Nos tratamentos com ração contendo 5g e 10g de probiótico.kg<sup>-1</sup>, foram recuperados  $1,15 \times 10^4$  e  $4,74 \times 10^5$  Unidades Formadoras de Colônias, respectivamente. As contagens de *B. subtilis* foram crescentes em relação aos níveis de inclusão do probiótico na ração.

**Palavras-chave:** Microbiologia. *Oreochromis niloticus*. Piscicultura. Probiótico.

## ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the zootechnical performance of Nile tilapia fed with probiotic Bacillus subtilis during the sex reversal phase and confirm the presence of this probiotic in the intestine. A total of 1,350 fish, M=16.0, SD=5.2mg mean weight and M=9.6, SD=9.1mm mean length, were stocked in 18 rectangular aquariums (15L) at a stocking density of 5 fish.L<sup>-1</sup>. The experimental definition was completely random with three treatments (control, 5g and 10g of probiotic per kg of feed) and six replications, during 30 days of experiments. Six animals per treatment were used for microbiological analysis, euthanized and decontaminated externally with alcohol (70%). The intestines were removed and steeped in sterilized test tubes, serially diluted to  $10^{-2}$  and spread on to plates with "Tryptic Soy Agar". Zootechnical parameters were not affected by the inclusion of probiotic in the diet. Fish treated in the control group did not demonstrate B. subtilis growth on intestine culture plates, indicating no contamination of the aquarium or control group feed. In treatments with 5g and 10g of probiotic per kg,  $1.15 \times 10^4$  and  $4.74 \times 10^5$  CFU (Colony Forming Unit) were recovered respectively. The B. subtilis count grew in keeping with the levels of probiotic included in the diet.*

**Key words:** Microbiology. *Oreochromis niloticus*. Fish culture. Probiotic.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura vem se impondo como atividade pecuária, embora ainda seja considerada por muitos como um apêndice do setor pesqueiro (Scorvo-Filho, 2006).

Nos últimos anos, tem-se intensificado o número de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de alimentos funcionais e de substâncias químicas que promovam o aumento da eficiência alimentar e da taxa de crescimento dos peixes (Oliveira et al., 2002), aumento da resistência do animal às doenças infecciosas (Barbosa et al., 2005) e a redução do uso de antibióticos como promotor de crescimento (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

Dentre os alimentos funcionais, ou seja, alimentos que fornecem a nutrição básica e a

melhora da saúde de peixes, encontram-se os probióticos, que são suplementos alimentares compostos de micro-organismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, pelo equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller, 1989). Em sua maioria, são produtos preparados com *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, e em alguns casos, leveduras (Verschuere et al., 2000; Wang et al., 2008). A definição de probióticos para organismos aquáticos necessitou da inclusão dos benefícios causados pelos organismos que interagem com o ambiente. Verschuere et al. (2000, p.657) propuseram a definição de que probióticos são: "organismos vivos adjuntos que tem efeito benéfico sobre o hospedeiros, pela modificação do hospedeiro associado ou comunidade microbial do ambiente, assegurando o aumento do uso alimentar ou valor

nutricional, aumentando a resposta do hospedeiro sobre a doença, ou pelo aumento da qualidade do ambiente”, prevendo também a interação do animal com o seu ambiente e ampliando a aplicabilidade do conceito na aquicultura.

O mecanismo de ação dos probióticos pode ocorrer pela exclusão competitiva (Ozawa et al., 1978; Vine et al., 2004), pela competição por locais de adesão no aparelho digestório (Watkins & Miller, 1983; Yan et al., 2002), por estímulo da imunidade (Inooka et al., 1986; Son et al., 2009), por maior produção de ácido láctico (Fuller, 1977), pela diminuição da produção de amins tóxicas, pelo aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (Kozasa, 1989), por economia de energia e por aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (Fuller, 1989). A digestão dos alimentos pode ser afetada devido ao funcionamento ideal das células das vilosidades intestinais, que absorvem os nutrientes com maior eficiência quando bactérias benéficas estão presentes, como demonstrado para frangos de corte (Silva, 2008) e peixes (Hisano et al., 2006). Existe, também, a possibilidade das bactérias aeróbicas associadas ao trato gastro intestinal de peixes produzirem enzimas digestivas que facilitam a digestão do alimento (Bairagi et al., 2002).

O uso convencional de drogas desinfetantes e antimicrobianos tem limitado o sucesso na prevenção e cura de doenças de organismos aquáticos (Subasinghe, 1997). No entanto, os testes com probiótico na aquicultura vêm apresentando resultados promissores na criação de larvas e pós-larvas e formas jovens de peixes, moluscos e crustáceos e rãs (Planas & Cunha; 1999; Verschuere et al., 2000; Dias et al., 2008; Kesarcodi-Watson et al., 2008). Sendo que os gêneros dos probióticos mais utilizados com sucesso na piscicultura em água doce são as bactérias *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e as leveduras *Saccharomyces* (Verschuere et al., 2000; Lara-Flores et al., 2003; Meurer et al., 2006; Aly et al., 2008; Meurer et al., 2008; Wang et al., 2008).

Em relação aos probióticos testados em tilápia-do-Nilo foram realizados alguns trabalhos. Lara-Flores

et al. (2003) avaliaram o efeito da inclusão de 0,1% da mistura de *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* e, outra dieta contendo 0,1% de *Saccharomyces cerevisiae* e observaram que os peixes que receberam a mistura de bactérias obtiveram uma taxa de crescimento específico maior em relação ao grupo controle e, o grupo que recebeu a levedura teve crescimento e sobrevivência superior ao grupo controle, demonstrando que estes probióticos podem ser utilizados como promotores de crescimento na criação de tilápia.

Wang et al. (2008) avaliaram o efeito de *Enterococcus faecium* aplicado na água dos aquários, e observaram maior crescimento em peso e maior atividade imunológica da mieloperoxidase, *burst* respiratório e fagócitos sanguíneos no grupo que recebeu a bactéria.

*B. subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e demonstrou capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *Aeromonas hydrophila* e, na alimentação da tilápia-do-Nilo, foi eficaz como promotor de crescimento, além de aumentar a imunidade (Aly et al., 2008).

Ainda utilizando *B. subtilis*, El-Haroun et al. (2006) observaram aumento nos parâmetros de desempenho no ganho em peso, conversão alimentar e crescimento específico das tilápias-do-Nilo alimentadas com o probiótico comercial Biogen® composto por esta bactéria, alicina e enzimas hidrolíticas.

Este trabalho objetivou avaliar o desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo, na fase de inversão sexual, com a utilização do probiótico *Bacillus subtilis*, na forma do produto comercial, incluído na dieta e confirmar a presença desse probiótico no intestino.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) Pólo Regional de Desenvolvimento Sustentável dos Agronegócios do Vale do Ribeira/Setor de Piscicultura, município de Pariquera-Açu (SP).

Em março de 2008 foi realizada uma coleta de Pós-Larvas (PL) de tilápia-do-Nilo, selecionadas em malha de abertura de 3mm para obtenção de peixes menores que 13mm de comprimento total. As PL foram estocadas em 18 aquários retangulares (27,0 x 35,0 x 27,0cm) de polietileno, com 15L. O sistema de filtragem individual da água foi composto por bomba de água submersa de 250 L.h<sup>-1</sup> conectada ao filtro de espuma cilíndrica. As PL foram estocadas nos aquários na densidade de 5 PL.L<sup>-1</sup>, totalizando 1 350 peixes, com peso médio inicial de 16,0, Desvio- -Padrão (DP)=5,2mg e comprimento total de Média (M)=9,6, DP=9,1mm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (níveis de probióticos) e seis repetições, sendo o período experimental de trinta dias.

O probiótico utilizado foi o CALSPORIN® que continha 10<sup>9</sup> UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Bacillus subtilis* por grama do produto. Os tratamentos foram compostos por controle (sem adição de probiótico), 5 e 10g do produto comercial por quilograma de ração. A ração utilizada foi a comercial farelada, com 48% de proteína bruta, fornecida cinco vezes ao dia, *ad libitum*, nos horários de 8, 11, 13, 15 e 17 horas. O probiótico foi pesado em balança analítica e misturado (homogeneizado) na ração. A adição do hormônio masculinizante na dieta foi realizada de acordo com Guerrero (1982) utilizando-se 60mg de 17a-metiltestosterona.kg<sup>-1</sup> de ração.

As biometrias foram realizadas no início e após trinta dias, medindo-se o comprimento total (paquímetro) de 15 peixes por parcela e peso de todos os peixes (balança analítica com precisão de 0,001g). Foram observadas as taxas de sobrevivência (%) contando-se os peixes de cada aquário.

Posteriormente, seis animais por tratamento foram encaminhados para análise microbiológica. Estes animais foram eutanasiados com benzocaína (10 mg.L<sup>-1</sup>) e descontaminados externamente com álcool 70%, por imersão em recipiente de vidro durante cinco minutos. Os intestinos foram retirados, pesados e macerados em tubos de ensaio previamente esterilizados, feitas diluições seriadas

até 10<sup>-2</sup> e, semeadas em placas contendo meio *Tryptic Soy Agar* (TSA), em duplicata (Irianto & Austin, 2002). As placas foram incubadas em estufas a 30°C por 48h, para posterior contagem das colônias. As colônias de *B. subtilis* observadas foram expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de intestino.

Para confirmar a eficiência da inversão sexual, trinta peixes de cada tratamento foram mantidos mais trinta dias após o período de inversão sexual, até atingirem 4,0cm de comprimento total, possibilitando as análises das gônadas pelo método Aceto-Carmin Squash (Guerrero & Shelton, 1974).

Os parâmetros avaliados foram: biomassa final, fator de condição de Fulton (Le Cren, 1951), taxa de crescimento específico [(ln peso no tempo 1 - ln peso no tempo 0) tempo], sobrevivência, UFC do trato gastrointestinal e taxa de eficiência de inversão sexual.

Os parâmetros de água avaliados, semanalmente, foram oxigênio dissolvido (oxímetro digital YSI-55 - mg de O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), pH (phmetro digital - HANNA), alcalinidade total e dureza (segundo Golterman *et al.*, 1978), amônia total (kit Labcon™ test - mg de NH<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>) e temperatura máxima e mínima diária (termômetro de mercúrio - 1°C).

Os dados foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados em porcentagem de inversão sexual foram analisados pelo teste de Qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os aquários, permanecendo dentro do ideal segundo Popma & Green (1990). As médias gerais foram: oxigênio dissolvido M=5,34, DP=0,22mg.L<sup>-1</sup>; pH: M=8,15, DP=0,21; alcalinidade M=111,56, DP=13,58mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>; amônia abaixo de 0,25mg.L<sup>-1</sup> e temperatura M=29,28, DP=0,94°C.

As análises estatísticas não demonstraram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos nos parâmetros de desempenho avaliados que estão demonstrados na Tabela 1. Assim como Aly et al. (2008) trabalhando com jovens de tilápia-do-Nilo não observaram diferenças no crescimento em peso entre os peixes alimentados com e sem o probiótico *Bacillus pumilus*. No entanto, estes autores detectaram aumento no nível de proteção relativa dos peixes alimentados com o probiótico, medida pela infecção dos peixes com a bactéria patogêna *Aeromonas hydrophyla*, correlacionando a taxa de mortalidade dos peixes alimentados e não alimentados com probiótico. Portanto, alguns probióticos sob determinadas condições não tem efeito sobre o crescimento dos peixes, tanto em peso como comprimento total e necessitam de algum estímulo estressor para demonstrar os efeitos benéficos sobre a capacidade de resposta, principalmente, imunológica.

A sobrevivência não foi afetada pela utilização do probiótico, no entanto, Lara-Flores et al. (2003) observaram que peixes em altas densidades de estocagem (fator estressante), alimentados com probióticos, apresentaram maior sobrevivência em relação ao grupo controle. A melhora nas condições de saúde do peixe alimentado com probióticos se deve principalmente à diminuição de bactérias nocivas por exclusão competitiva e consequentemente, redução da descamação do epitélio da mucosa intestinal (Ozawa et al., 1978) acarretando maior gasto de nutrientes. Além da parede celular das bactérias e leveduras atuarem como imunostimulante (Aly et al., 2008).

A taxa de inversão sexual não foi afetada pela inclusão do probiótico na dieta, assim como Meurer et al. (2006), não observaram alterações na taxa de inversão sexual quando alimentou pós-larvas de tilápia-do-Nilo com *Saccharomyces cerevisiae*, portanto, possivelmente, o probiótico não interfira na fisiologia hormonal dos peixes.

Nos peixes do tratamento controle, não se detectou o crescimento de *Bacillus subtilis* nas placas, demonstrando que não houve contaminação dos aquários e da ração do tratamento controle e, que a bactéria não estava presente no sistema. Nos tratamentos com ração contendo 5g e 10g de probiótico.kg<sup>-1</sup>, foram recuperados M=1,06x10<sup>6</sup>, DP=5,93x10<sup>5</sup> e M=3,90x10<sup>7</sup>, DP=1,80x10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de intestino.

Estes dados mostram que a ração contendo probiótico foi ingerida pelas tilápias e existe a possibilidade de recuperação destas bactérias no intestino. Os valores de UFC.g<sup>-1</sup> observados foi maior nos peixes que receberam 10g do probiótico. Meurer et al. (2006; 2007; 2008) também observaram a colonização da levedura *S. cerevisiae* no intestino, quando se alimentou pós-larvas e formas jovens de tilápia-do-Nilo. A recuperação das bactérias probióticas é importante para certificar-se do consumo destas e se continuam viáveis no intestino dos peixes para agirem como probiótico. Entretanto, a adesão e a colonização do trato gastro-intestinal não pode ser confirmada com esta análise, somente com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Ringo et al., 2003).

**Tabela 1.** Médias pós-larvas de tilápia-do-Nilo alimentadas com diferentes níveis de probiótico (CALSPORIN®), durante a fase de inversão sexual. Pariquera-Açu (SP), 2008\*.

Trat. (g kg <sup>-1</sup> )	PI (mg)	PF (mg)	CTI (cm)	CTF (cm)	Sobrev (%)	TCE (%)	FC	BF (g)	
0	M	16,00	307,75	0,96	2,80	67,33	9,70	1,46	15,31
	DP	5,62	95,44	0,09	0,19	16,14	0,92	0,66	5,76
5	M	16,00	327,03	0,96	2,98	60,00	9,92	1,38	13,62
	DP	5,63	100,68	0,10	0,23	16,87	0,92	0,90	0,89
10	M	16,00	278,56	0,96	2,79	67,77	9,46	1,29	13,70
	DP	5,64	50,08	0,11	0,12	12,54	0,64	0,30	0,79

\* Não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) dos dados pela análise de variância.

PI: peso inicial; PF: peso final; CTI: comprimento total inicial; CTF: comprimento total final; Sobrev: sobrevivência; TCE: taxa de crescimento específico; FC: fator de condição; BF: biomassa final; DP: desvio-padrão; M: média.



## CONCLUSÃO

O probiótico contendo o *Bacillus subtilis*, incluído na alimentação não provocou diferenças no desempenho zootécnico das pós-larvas de tilápia-do-Nilo.

É possível a detecção de *Bacillus subtilis* viáveis em intestinos da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo estas bactérias como produto probiótico.

As contagens de *Bacillus subtilis* no intestino foram crescentes em relação aos níveis de inclusão de probiótico na ração.

## REFERÊNCIAS

- Aly, S.M.; Ahmed Y.A.G.; Ghareeb, A.A.A. & Mohamed, M.M. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1-2):128-36.
- Bairagi, A.; Ghosh, K.S.; Sem, S.K. & Ray, A.K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10(2):109-21.
- Barbosa, T.M.; Serra, C.R.; Ragione, R.M.; Woodward, M.J. & Henriques, A.O. (2005). Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2):968-78.
- Dias, D.C.; Stéfani, M.V.; Ferreira, C.M. & França, F.M. (2008). Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. *Archivos de Zootecnia*, 57(220):449-55.
- El-Haroun, E.R.; Goda, A.M.A-S. & Chowdhury, A.K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feces utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14):1473-80.
- Fuller, R. (1977). The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Brazilian Poultry Science*, 18(1):85-94.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals: a review. *Journal of Applied Bacteriology*, 66:365-78.
- Goltzman, H.L.; Clymo, R.S. & Ohnstad, M.A.M. (1978). *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. London: Blackwell Science Publication.
- Guerrero, R.D. & Shelton, W.L. (1974). An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1):56.
- Guerrero, R.D. (1982). Control of tilapia reproduction. In: Pullin, R.S.V. & McConnell, R.H. (Ed). *The biology and culture of tilapias*. Manilla: ICLAM Conference Proceeding.
- Hisano, H.; Silva, M.D.P.; Barros, M.M. & Pezzato, L.E. (2006). Levedura íntegra e derivados de seu processo em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Scientiarum Biology Science*, 28(4):311-8.
- Inooka, S.; Uehara, S. & Kimura, M. (1986). The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. *Poultry Science*, 65(6):1217-19.
- Irianto, A. & Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6):333-42.
- Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J. & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1):1-14.
- Kozasa, M. (1989). Probiotics for animal use in Japan. *Technique de La Office Internacional des Epizooties*, 8(2):517-31.
- Lara-Flores, M.; Olevera-Novoa, M.A.; Guzmán-Méndez, B.E. & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1-4):193-201.
- Le Cren, E.D. (1951). The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20:201-19.
- Meurer, F.; Hayashi, C.; Costa, M.M.; Mauerwerk, V.L. & Freccia, A. (2006). Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-Nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(5):1881-6.
- Meurer, F.; Hayashi, C.; Costa, M.M.; Mauerwerk, V.L. & Freccia, A. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-Nilo submetidos a desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(5):1219-24.
- Meurer, F.; Hayashi, C.; Costa, M.M.; Mauerwerk, V.L.; Mascioli, A.S.; Colpini, L.M.S., et al. (2008). Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9(4):804-12.
- Oliveira, M.N.; Sivieri, K.; Alegro J.H.A. & Saad, S.M.I. (2002). Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(1):1-21.
- Ozawa, K.; Yabu-Uchi, K. & Yamanak, K. (1978). Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. *Microbiology Immunology*, 23(12):1147-56.

- Planas, M. & Cunha, I. (1999). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177(1):171-90.
- Popma, T.J. & Green, B.W. (1990). *Sex reversal of tilapia in earthen ponds: aquaculture production manual*. Alabama: Auburn University. (Alabama Research and Development, Series 35).
- Ringo, E.; Olsen, R.E.; Mayhewc, T.M. & Myklebustd, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227(1-4):1-4.
- Scorvo Filho, J.D. (2006). Panorama da aquicultura nacional. Disponível em: <[http://www.pesca.sp.gov.br/arquivos/Panorama\\_aquicultura.doc](http://www.pesca.sp.gov.br/arquivos/Panorama_aquicultura.doc)>. (acesso: 15 maio 2006).
- Silva, C.R. (2008). *Uso de probióticos em rações para frangos de corte: desempenho, digestibilidade e energia metabolizável*. Dissertação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.
- Son, V.M.; Chang, C.C.; Wu, M.C.; Guu, Y.K.; Chiu, C.H. & Cheng, W. (2009). Dietary administration of probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5):691-8.
- Subasinghe, R. (1997). Fish health and quarantine. In: Review of the state of the world aquaculture. Rome: FAO. p.45-9. (FAO Fishries circular, n. 886).
- Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4):655-71.
- Vine, N.G.; Leukes, W.D.; Kaiser, H.; Daya, S.; Baxter, J. & Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27:319-26.
- Wang, Y.B.; Tian, Z.Q.; Yao, J.T. & Li, W.F. (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277(3-4):203-7.
- Watkins, B.A. & Miller, B.F. (1983). Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, 61(9):1772-9.
- Yan, L.; Boyd, K.G. & Burgess, J.G. (2002). Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Marine Biotechnology*, 4(4):356-66.

Recebido em: 1/6/2009

Versão final reapresentada em: 28/4/2010

Aprovado em: 7/6/2010