

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**PROBIÓTICO NA CRIAÇÃO DE ROBALO-FLECHA E LAMBARI EM
TANQUES-REDE**

André Pedro Noffs

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Coorientador: Leonardo Tachibana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo
Setembro – 2013**

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**PROBIÓTICO NA CRIAÇÃO DE ROBALO-FLECHA E LAMBARI EM
TANQUES-REDE**

André Pedro Noffs

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Coorientador: Leonardo Tachibana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo
Setembro – 2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

N773p

Noffs, André Pedro
Probiótico na criação de robalo-flecha e lambari em tanques-rede / André Pedro
Noffs – São Paulo, 2014.
vi, 67f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e
Abastecimento.

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva

1. *Bacillus subtilis*. 2. *Centropomus undecimalis*. 3. *Astyanax sp.* 4. Piscicultura
marinha. 5. Desempenho zootécnico. 6. Isca-viva. I. Ranzani-Paiva, Maria José.
II. Título.

CDD 639.3

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

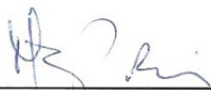
**“PROBIÓTICO NA CRIAÇÃO DE ROBALO-
FLECHA E LAMBARI EM TANQUES-REDE”**

AUTOR: André Pedro Noffs

ORIENTADOR: Maria José Tavares Ranzani-Paiva

CO - ORIENTADOR: Leonardo Tachibana

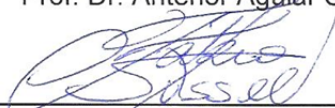
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

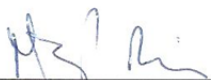


Prof. Dr. Antenor Aguiar Santos



Prof. Dr. Fábio Rosa Sussel

Data da realização: 24 de setembro de 2013



Presidente da Comissão Examinadora
Prof.ª. Dr.ª. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, Paulo e Célia, por terem despertado em mim a curiosidade, a vontade de saber mais, mas principalmente a paixão pelos peixes e pela água. Por terem me incentivado nos estudos, desde as primeiras palavras, se desdobrando pra oferecer, a mim e ao meu irmão, a melhor educação possível.

A Dani, minha namorada, pelo carinho e companheirismo, por ter me ajudado muito com as correções, revisões bibliográficas, pelos artigos baixados na Esalq e pela paciência com minhas lamentações quando tudo parecia dar errado.

A Masé, minha orientadora, por ter me iniciado neste mundo científico, me concedido a oportunidade de ingressar no programa sob sua orientação. Pelos importantes ensinamentos sobre hematologia e conselhos sobre a vida acadêmica. E também pelos comandos, atalhos e funções que me ensinou no Word, que muito me ajudaram ao redigir esta dissertação.

Ao Tachibana, meu coorientador, pelos grandes períodos de conversa e discussões que tivemos, pelos ensinamentos em piscicultura, pela colaboração no momento das análises e pelas aulas na UNESP em Registro, ainda na graduação, que me incentivaram a dar sequência com os estudos em peixes.

Ao Léo (Dr. Antonio Fernando Gervásio Leonardo), pela ajuda no meu experimento na APTA em Pariquera-Açú, pelas descobertas que fizemos juntos com os lambaris, por ter acreditado no potencial do meu trabalho e me disponibilizado a estrutura da estação de piscicultura, além de ter me incentivado no ramo da assistência técnica no Vale do Ribeira.

A banca examinadora composta pelo Dr. Antenor Aguiar Santos e a Dr^a. Danielle de Carla Dias pelas correções, ajuda e conselhos dados no exame de qualificação, assim como a Dr^a. Elisabeth Romagosa e ao Dr. Carlos Ishikawa pelas correções e a doutoranda Camila Corrêa pela revisão e ajuda.

Ao Guilherme Telli, pela disposição e companheirismo, pela ajuda com as análises estatísticas e pelas conversas sobre hematologia que tivemos.

Ao André Koga, por ter me ajudado muito com as análises do *burst* respiratório, assim como a equipe do LIAH da UNASP.

Ao Seu Dito, ao Dil e ao André, pela enorme ajuda com os lambaris na estação da APTA e por tudo que me ensinaram sobre piscicultura.

Ao Jorginho, lá de Pedrinhas, que muito nos ajudou com o projeto dos robalos. Apesar dos atritos e problemas, sem ele o projeto não teria tido sucesso.

Ao Dr. Oswaldo Oyakawa, do Museu de Zoologia da USP pela identificação dos lambaris e fundamental ajuda com a taxonomia.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto dos robalos e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os amigos e colegas de mestrado do Instituto de Pesca, em especial ao Fábio Japinha, pela hospedagem em Santos na primeira disciplina que fizemos, a Bianca pela ajuda com meu experimento e ao Bernardo pelo grande apoio na qualificação.

Ao Instituto de Pesca e ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura e Pesca pela oportunidade de avanço nos conhecimentos e ingresso na vida acadêmica.

E a todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho. Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1. Probióticos: definições e experiências.....	01
1.2. Piscicultura marinha e <i>Centropomus undecimalis</i>	04
1.3. Lambari <i>Astyanax</i> sp. 1.....	06
2. JUSTIFICATIVA.....	09
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo geral.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 1.	18
Probiótico na alimentação de robalo-flecha criado em tanque-rede no estuário de Cananéia-Iguape	
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1. Local e período experimental.....	22
2.2. Desenho experimental e peixes.....	23
2.3. Dietas experimentais.....	24
2.4. Análises.....	25
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO.....	31
5. CONCLUSÃO.....	35
6. AGRADECIMENTOS.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2.	39
Probiótico na alimentação e na água de transporte de lambari para ser comercializado como isca-viva	
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Primeira etapa: desafio alimentar, desempenho zootécnico, composição corporal e <i>burst</i> respiratório.....	42
2.1.1. Local do experimento e peixes.....	42
2.1.2. Delineamento e dietas experimentais.....	43

2.1.3. Análises.....	44
2.2. Segunda etapa: resistência ao transporte e armazenamento como isca-viva.....	47
2.2.1. Desenho experimental.....	47
2.2.2. Análises.....	48
2.3. Análises estatísticas.....	50
3. RESULTADOS.....	51
3.1. Primeira etapa.....	51
3.2. Segunda etapa.....	52
4. DISCUSSÃO.....	54
4.1. Primeira etapa.....	54
4.2. Segunda etapa.....	57
5. CONCLUSÃO.....	59
6. AGRADECIMENTOS.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	60
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64

PROBIÓTICO NA CRIAÇÃO DE ROBALO-FLECHA E LAMBARI EM TANQUES-REDE

Resumo: Objetivou-se com este trabalho avaliar a bactéria probiótica *Bacillus subtilis* na criação em tanques-rede do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, em ambiente estuarino e do lambari, *Astyanax* sp.1, em água-doce. Também foi verificada a eficácia do probiótico na resistência ao transporte e comercialização dos lambaris como isca-viva. Foram testadas diferentes concentrações, formas de administração e regimes de fornecimento do probiótico aos peixes. O uso de 5×10^9 UFC kg^{-1} da bactéria *B. subtilis* como aditivo na ração do robalo-flecha não promoveu o crescimento, mas atuou como imunoestimulante quando adotado o regime alternado de fornecimento. A concentração de 5×10^9 UFC kg^{-1} de *B. subtilis* ofertada continuamente como aditivo alimentar na dieta de *Astyanax* sp. 1 não interferiu nos parâmetros zootécnicos, mas aumentou o tempo de sobrevivência dos peixes nas embalagens de transporte e diminuiu a concentração de amônia total na água. A inclusão de $0,5 \times 10^9$ UFC L^{-1} de probiótico na água de transporte dos lambaris não demonstrou resultados satisfatórios, enquanto que a oferta contínua de 10×10^9 UFC kg^{-1} na ração promoveu maior acúmulo de proteínas na carcaça dos lambaris. A bactéria *Bacillus subtilis* atuou como probiótico nas duas espécies testadas, podendo ser indicada para estudos posteriores.

palavras-chave: *Bacillus subtilis*; *Centropomus undecimalis*; *Astyanax* sp. 1; piscicultura marinha; desempenho zootécnico; isca-viva

PROBIOTIC IN COMMON SNOOK AND “LAMبارI” RAISED IN NET-CAGES

Abstract: The aim of this study was to evaluate the influence of probiotic bacteria, *Bacillus subtilis*, in common snook, *Centropomus undecimalis*, raised in net-cages in estuarine environment and “lambari” *Astyanax* sp.1 in freshwater. It was also verified the effectiveness of probiotic in the resistance to transport and marketing of “lambari” as live-bait. Different concentrations, dosage forms and schedules supplies of probiotic to fish were tested. The use of 5×10^9 CFU kg^{-1} of *B. subtilis* as an additive in the feed of common snook could not be considered as a growth promoter, but acted as an immunostimulant when adopted alternating supply schedule. The concentration of 5×10^9 CFU of kg^{-1} *B. subtilis* continuously supplied as a food additive in the diet of *Astyanax* sp. 1 did not affect the performance parameters, but increased the survival time of fish in transport packaging and decreased the concentration of total ammonia in the water. The inclusion of 0.5×10^9 CFU of probiotic L^{-1} in water transport of “lambari” did not shows satisfactory results. The continuous supply of 10×10^9 CFU kg^{-1} in the diet increased the concentration of protein in the carcass of *Astyanax* sp. 1. The bacteria *Bacillus subtilis* acted as a probiotic in the two species tested, and may be indicated for further studies.

Key-words : *Bacillus subtilis*; *Centropomus undecimalis*; *Astyanax* sp. 1; marine fish farming, growth performance; live-bait

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Probióticos: definições e experiências

As doenças bacterianas são comumente associadas à produção aquícola. *Vibrios*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* são alguns dos principais agentes causadores (AUSTIN and AUSTIN, 2007). Dixon (1991) correlacionou as doenças bacterianas nos peixes com problemas de manejo e fatores ambientais, como estresse, mudanças de temperatura, salinidade, qualidade da água, parasitas e tratamentos quimioterápicos mal conduzidos. Para controlá-las, os antibióticos são largamente utilizados, mas o seu uso inadequado pode levar à seleção de algumas cepas de bactérias patogênicas resistentes e, também, ser uma fonte de poluição do meio ambiente (BOYD e MASSAUT, 1999). Para Jatobá *et al.* (2008), o uso de probióticos pode ser uma alternativa viável para a diminuição do uso de quimioterápicos em organismos aquáticos.

Os probióticos são considerados alimentos funcionais e definidos como suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989). Verschuere *et al.* (2000), propuseram a definição de que probióticos são organismos vivos adjuntos, que têm efeito benéfico sobre os hospedeiros, pela sua modificação ou pela alteração da comunidade microbiana do ambiente, assegurando o aumento da eficiência alimentar, aumentando a resposta sobre as doenças. Schrezenmeir e De Vrese (2001) consideraram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alterem, por colonização, a microbiota própria das mucosas do sistema digestório do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde.

Certas características são imprescindíveis para que um microorganismo possa ser considerado probiótico e agir de forma eficiente em uma espécie alvo, tais como: ter capacidade de colonização do trato digestório; possuir resistência à ação da bile, secreções pancreáticas e intestinais, às variações de pH, principalmente do suco gástrico, bem como ao sistema imunológico do hospedeiro; manter-se vivo por longo tempo durante transporte e armazenamento, para que possa colonizar o hospedeiro eficientemente; não

transportar genes transmissores de resistência à antibióticos e reduzir ou eliminar a presença de determinados microorganismos patogênicos no hospedeiro (FULLER, 1989; VERSCHUERRE *et al.*, 2000; BOMBA *et al.*, 2002; HOLZAPFEL *et al.*, 2002).

Ainda existem lacunas sobre o mecanismo de ação dos probióticos, mas, na aquicultura, foi demonstrado que promovem incremento no desempenho reprodutivo, no ganho de peso, na conversão alimentar, no aproveitamento dos nutrientes da ração, na resistência ao estresse, além de beneficiar o ambiente de cultivo com a melhoria da qualidade de água (CARNEVALI *et al.*, 2006; WANG, 2007; BALCÀZAR *et al.*, 2007; ALY *et al.*, 2008; CAVALLI e HAMILTON, 2009; SON *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2012). Os probióticos podem ser oferecidos como suplemento adicionado na ração, no enriquecimento de alimento vivo, em banhos profiláticos ou diretamente na água de cultivo ou transporte (BALCÀZAR *et al.*, 2007).

Jatobá *et al.* (2008) demonstraram que tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com cepas de *Lactobacillus plantarum* apresentaram maior resistência ao manejo, cultivo e repovoamentos em relação aos peixes que não receberam os probióticos. Rengpipat *et al.* (2008) mostraram o efeito benéfico sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis de robalo-asiático (*Lates calcarifer*), utilizando *Lactobacillus* spp.

Carnevali *et al.* (2006), testando a influência do uso de probiótico na alimentação de juvenis de robalo-europeu *Dicentrarchus labrax*, utilizando *L. delbrueckii delbrueckii* isolados do próprio robalo-europeu, registraram ganho em peso 81% maior nos peixes alimentados com o probiótico quando comparados ao grupo controle, demonstrando assim o efeito positivo de bactérias ácido-láticas sobre parâmetros zootécnicos de crescimento e destacando a especificidade das cepas bacterianas isoladas da própria espécie.

Souza *et al.* (2010), evidenciaram que os robalos (*Centropomus parallelus*) alimentados com ração suplementada com o probiótico *L. plantarum* e com *Lactococcus* spp., apresentaram, no trato intestinal, uma contagem total de *Vibrio* spp. inferior ao grupo controle, além de demonstrarem incrementos na produção de protease e na resistência ao estresse. Barbosa *et al.* (2011), em experimento realizado com juvenis de robalo-peva criados no sistema de

tanque-rede em viveiro escavado, demonstraram que ao oferecer probiótico na ração, houve grande capacidade de colonização de *L. plantarum* no intestino dos peixes, que o índice hepatossomático foi significativamente maior nos peixes que receberam o probiótico e que, nesses peixes, a imunocompetência foi beneficiada, pois houve aumento no número total de leucócitos, trombócitos e linfócitos circulantes.

O *Bacillus subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e demonstrou capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *Aeromonas hydrophila*. Na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) foi eficaz como promotor de crescimento além de aumentar a imunidade dos animais tratados (ALY *et al.*, 2008). DIAS *et al.* (2012) reportaram incremento na capacidade reprodutiva e na atividade fagocítica de reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*) alimentados com ração adicionada de *B. subtilis* na concentração de 10^{10} UFC kg⁻¹.

O sistema imune dos peixes é diferente de outros vertebrados, não apresentando linfonodos ou medula óssea. A imunidade inata dos teleósteos, diferentemente dos mamíferos, é mais atuante do que a específica. Compreende uma série de respostas do organismo contra infecções, independentemente da etiologia da lesão (química, física ou biológica) (BOLS *et al.*, 2001) A capacidade dos probióticos de modular o sistema imune em peixes já foi comprovada em diversos trabalhos. (ALY *et al.*, 2008; SON *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2011). Isto ocorre por meio do aumento da produção de glicoproteínas e citocinas, pela proliferação de células T (linfócitos T) e da ativação dos fagócitos (PANCHENIAK, 2005).

O processo de fagocitose é um dos principais mecanismos de defesa da imunidade inata dos peixes, sendo realizado por neutrófilos, monócitos-macrófagos e, em alguns peixes, por trombócitos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Santos *et al.* (2011) analisando a ultra-estrutura do rim cefálico de *C. parallelus*, encontraram uma grande atividade hematopoiética de eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e trombócitos, concluindo ser esse um dos principais órgãos na produção de células sanguíneas e a principal fonte de macrófagos da espécie.

Os fagócitos, durante a atividade fagocítica, liberam espécies reativas de oxigênio (ERO's), como os ânions superóxido (O₂⁻), que geram o peróxido de

hidrogênio ($H_2O_2^-$), posteriormente convertido em ácido hipocloroso (HClO) pela enzima mieloperoxidase, sendo o HClO o responsável por matar os patógenos por oxidação. O consumo de oxigênio durante a reação das ERO's é chamado de explosão respiratória, ou *burst* respiratório (BABIOR, 1988).

O estudo do *burst* respiratório, ou explosão respiratória, vem sendo utilizado como parâmetro para dimensionar a resposta imune dos animais e os fagócitos dos rins cefálicos são os mais comumente utilizados (COOK *et al.*, 2003; ABREU *et al.*, 2009; SON *et al.*, 2009). Geng *et al.* (2011) verificaram incremento no *burst* respiratório de bijupirá (*Rachycentron canadum*), alimentados com uma combinação de quitosana e *B. subtilis* incluídos na ração, quando comparado com os peixes do controle, enquanto que Dias-Rosález *et al.* (2006) e Cerezuela *et al.* (2012) não encontraram diferenças estatísticas entre os peixes tratados com probióticos e os peixes controle.

1.2. Piscicultura marinha e *Centropomus undecimalis*

No Brasil, a criação de peixes marinhos provavelmente teve início no século XVII no Estado de Pernambuco, durante o governo holandês de Maurício de Nassau. Naquela época, robalos (*Centropomus* spp.), tainhas (*Mugil* spp.) e carapebas (*Eugerres* spp. e *Diapterus* spp.) eram cultivados extensivamente em viveiros de maré (VON IHERING, 1932), produzindo até 280 toneladas ano⁻¹.

Apesar de um início promissor, atualmente a piscicultura marinha não consta nas estatísticas de produção de pescado do Brasil (BRASIL, 2010), estando praticamente limitada às iniciativas das instituições de pesquisa (ROUBACH *et al.*, 2003), onde principalmente o robalo-peva (*C. parallelus*) foi estudado (CERQUEIRA, 2005).

Outras espécies já foram alvos de estudos ou vem sendo estudadas, porém com menor intensidade, como a tainha *M. platanus* (ROMAGOSA *et al.* 2000), a cioba *Lutjanus analis* (SANCHES e CERQUEIRA, 2011), a garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (SANCHES *et al.*, 2009) o linguado (*Paralichthys orbignyanus*) (SAMPAIO, 2008) e, mais recentemente, o bijupirá *Rachycentron canadum* (CAVALLI e HAMILTON, 2009) e o robalo-flecha *C. undecimalis* (SOLIGO *et al.*, 2008).

Das seis espécies de robalo encontradas no Oceano Atlântico, quatro são capturadas no litoral do Brasil, dentre as quais se destacam *C. undecimalis* e *C. parallelus*. O robalo-flecha (Figura 1) é a maior espécie da família, podendo atingir até 25 kg. Apresenta coloração acinzentada no dorso, com reflexos esverdeados e ventre esbranquiçado. As nadadeiras são bastante amareladas e possui a linha lateral formada por uma listra negra que se estende ao longo do corpo (CARVALHO-FILHO, 1992).



Figura 1. *Centropomus undecimalis* criado em tanques-rede na região de Cananéia-Iguape

São peixes de águas tropicais e subtropicais, de ampla distribuição desde o sul da Flórida, no Golfo do México, até o sul do Brasil, no Rio Grande do Sul (RIVAS, 1986; CERQUEIRA; 2005). No Brasil, habitam ambientes estuarinos, costeiros marinhos e lagunas ao longo de toda a costa. Entram nos rios adaptando-se facilmente às águas salobras e doces e, ocasionalmente, penetram em lagoas hipersalinas (MENDONÇA, 2004).

Devido à grande aceitabilidade para o consumo e para a pesca esportiva, as espécies do gênero *Centropomus* sofreram uma intensa pressão da pesca comercial e recreativa, evidenciada por Volpe (1959), que descreveu o colapso das populações de robalo-flecha na Flórida, e por Mendonça (1998), que relatou a redução da captura de robalo-peva na região do sistema Cananéia-Iguape. As cotações do robalo no mercado varejista atingem os mais

altos valores entre todos os peixes comercializados durante o ano (CEAGESP, 2013), aumentando sua procura por parte dos pescadores profissionais e artesanais. Contínuas degradações e alterações ambientais dos sistemas costeiros, em especial os estuarinos e lagunares, também vêm contribuindo para a depleção das populações de *Centropomídeos* (ALIAUME *et al.*, 2000).

Além do panorama da exploração sustentável dos estoques naturais, a possibilidade da inclusão do gênero *Centropomus* em programas de piscicultura comercial tem sido considerada pela comunidade científica, órgãos públicos e iniciativa privada. Neste sentido, alguns trabalhos zootécnicos e de biologia básica têm sido produzido nos últimos anos, muito embora não tenha se chegado ainda a um protocolo que viabilize a exploração comercial deste recurso (MACHADO, 2011).

A maior parte dos trabalhos com robalos, envolvendo probióticos, foram realizados com *C. parallelus* (SOUZA *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2011). Em *C. undecimalis*, Kennedy *et al.* (1998) encontraram maior sobrevivência em larvas criadas em água contendo 10^9 UFC ml⁻¹ de *B. subtilis* isolados da própria espécie quando comparado com os peixes controle. Grande parte dos estudos com esta espécie concentra os esforços nas fases iniciais de desenvolvimento, pois, na maioria dos casos, a finalidade da produção são os repovoamentos em ambiente natural. A criação comercial da espécie ainda não foi estruturada eficientemente, necessitando de mais pesquisas, principalmente em nutrição, manejo e melhoramento genético.

1.3. Lambaris *Astyanax* sp. 1

A fauna de peixes de água-doce do Brasil está entre as mais ricas e diversificadas do planeta, abrangendo aproximadamente trinta e nove famílias, quinhentos e dezessete gêneros e mais de duas mil e quinhentas espécies (BUCKUP *et al.*, 2007). Os estudos de espécies nativas com potencial zootécnico e características comerciais interessantes têm se destacado, visando atender a crescente procura por produtos oriundos da aquicultura (NAVARRO *et al.*, 2006).

Os peixes do gênero *Astyanax*, popularmente conhecidos como lambaris, são espécies nativas que possuem bons atributos zootécnicos, são bastante conhecidos e apreciados em todo o território nacional e possuem

nichos mercadológicos ainda pouco explorados, como a produção para isca-viva (SUSSEL, 2012). Povoam grandes rios, córregos, riachos, lagos e lagoas em todo o ambiente tropical brasileiro. Os lambaris são peixes de pequeno porte, possuem hábito alimentar onívoro e seu crescimento é rápido, chegando à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade. (GARUTTI, 2003).

Alguns trabalhos (GARUTTI e BRITSKI, 2000; BERTACO e GARUTTI, 2007) descrevem espécies semelhantes à *Astyanax bimaculatus* e *A. altiparanae* (Figura 2) que apresentam um padrão de coloração característico: uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada; uma mancha losangular negra no pedúnculo caudal, estendida à extremidade dos raios caudais medianos e duas barras verticais marrons na região umeral. As espécies com esse padrão de coloração pertencem ao complexo de espécies, denominado “*Astyanax* grupo *bimaculatus*”, constituído por diversas espécies similares e provavelmente muito próximas filogeneticamente (GARUTTI e LANGEANI, 2009).



Figura 2. *Astyanax altiparanae* (foto: Sussel, F.R.)

Na bacia do rio Ribeira de Iguape são encontradas diversas espécies do gênero *Astyanax*. Apresentam distribuição significativa por toda a sua área e ocorrem em grande abundância, ressaltando a sua importância para o sistema ecológico regional (OYAKAWA *et al.*, 2006). Há registro de uma espécie bastante semelhante a *A. bimaculatus*, sendo até então referida por Oyakawa

et al. (2006) como *Astyanax* sp.1 (Figura 3). Esta espécie ainda não foi descrita (informação pessoal, OYAKAWA) e não há registros de experiências com reprodução, criação em cativeiro e comercialização desses lambaris. Na região, são conhecidos como pico-peva ou picupeva.



Figura 3. *Astyanax* sp. 1 criado em tanque-rede na estação de Piscicultura da APTA – Pólo Regional do Vale do Ribeira

São peixes de pequeno porte, exemplares de cativeiro podem chegar a 17 cm de comprimento e até 70 g de peso. Habitam rios, riachos e lagoas sempre em baixas altitudes (até 50 m), onde se alimentam de larvas terrestres e insetos que caem na superfície da água (OYAKAWA *et al.*, 2006). Atingem a primeira maturação sexual em torno dos 90 dias em condições de cativeiro, com oito centímetros de comprimento para os machos, que apresentam espículas na nadadeira anal quando maduros sexualmente, e dez centímetros para as fêmeas, que demonstram o ventre bastante abaulado em função da maturação dos ovócitos nas gônadas (observação pessoal). Estas características também podem ser observadas em *A. altiparanae* e *A. bimaculatus* (AGOSTINHO *et al.*, 1984; GARUTTI, 2003).

Em estudo realizado no rio Ribeira de Iguape, por Corrêa *et al.* (2010), os lambaris foram elencados pelos pescadores ribeirinhos como principal alimento do robalo-peva (*Centropomus paralellus*) em determinados locais do rio, sendo relacionados como uma boa isca para a sua captura. Silva *et al.* (2011)

classificaram a produção e venda de lambaris para isca-viva como a principal forma de comercialização da espécie e Sussel (2012) como a mais rentável.

As maiores regiões produtoras do lambari no Estado de São Paulo localizam-se no norte e noroeste, justamente onde há a maior concentração de reservatórios das hidroelétricas. A grande concentração de espécies alóctones introduzidas como os tucunarés (*Cichla* spp.) e a corvina (*Plagioscion squamosissimus*) faz com que a atividade de pesca esportiva na região seja bastante desenvolvida, havendo uma demanda acentuada por iscas-vivas (SUSSEL, 2012). Na bacia do rio Ribeira de Iguape, o robalo-peva é o principal foco dos pescadores esportivos, havendo registro de campeonatos de pesca esportiva voltados somente para este peixe (CORRÊA *et al.*, 2010). Espécies introduzidas como o dourado (*Salminus maxillosus*), o bagre-africano (*Clarias gariepinus*) e o pintado (*Pseudoplatystoma* spp.) também são encontradas na região e o lambari *Astyanax* sp. 1 tem grande potencial para ser utilizado como isca-viva para capturá-los.

A comercialização de lambaris para isca-viva nas regiões produtoras é realizada de forma artesanal (SUSSEL, 2012), onde cada produtor/comerciante define o modo como seu produto será comercializado. Normalmente o consumidor se dirige ao comerciante nos finais-de-semana, com baldes ou caixas de isopor e adquire as iscas por unidade ou dúzias. O estresse causado nos lambaris no momento da captura e seleção provoca mortalidade e fugas devido ao hábito saltador da espécie (GARUTTI, 2003) o que pode causar prejuízos aos comerciantes e aos consumidores.

Os principais parâmetros de qualidade de água que influenciam diretamente a sobrevivência dos peixes durante o transporte e o armazenamento em sistemas fechados são os baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e o acúmulo de dióxido de carbono devido ao processo respiratório, a redução do pH causado pelo CO₂ e o aumento dos níveis de amônia e nitrito decorrentes da excreção dos peixes (PATERSON *et al.*, 2003).

As pesquisas em transporte de peixes vivos têm preconizado a redução do stress pelo controle das taxas metabólicas e degradação dos resíduos nitrogenados durante o transporte, mas raramente focam seus esforços em melhorar a resistência dos peixes antes do processo de embalagem (LIM *et al.*, 2003). O uso de probióticos em peixes já demonstrou diminuir o estresse

durante a criação (ROLLO *et al.*, 2006; TAOKA *et al.*, 2006), aumentar a sobrevivência e melhorar as condições da água durante o transporte (RAJ *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Os probióticos demonstraram resultados positivos em inúmeras espécies, tanto em desempenho produtivo como em parâmetros imunológicos, hematológicos e fisiológicos. A concentração e o regime de fornecimento de probióticos aos peixes ainda não são consenso entre os pesquisadores, sendo sugerido, ao final de seus trabalhos, que mais pesquisas sejam desenvolvidas na área.

O robalo-flecha é hoje o peixe de maior valor encontrado no mercado varejista e, não ao acaso, as pesquisas devem concentrar esforços em sua produção. Por haver poucos dados sobre a criação desta espécie em ambiente estuarino (a maioria dos materiais enfoca a produção de larvas e juvenis em laboratório) e sobre o uso de probióticos na sua alimentação, foi proposto o estudo “**Probiótico na alimentação de robalo-flecha criado em tanque-rede no estuário de Cananéia-Iguape**” a ser submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

O lambari *Astyanax* sp.1, encontrado nas águas do rio Ribeira de Iguape e em seus afluentes, nunca foi descrito em revisões taxonômicas. Por ter demonstrado boas características produtivas e haver um nicho mercadológico promissor de iscas-vivas na região propôs-se o estudo “**Probiótico na alimentação e na água de transporte de lambari para ser comercializado como isca-viva**” a ser submetido á revista Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Objetivou-se avaliar a influência da bactéria probiótica *Bacillus subtilis* na criação de *Centropomus undecimalis* e *Astyanax* sp. 1 em tanques-rede, na região do Vale do Ribeira, SP.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos dos regimes contínuo e alternado de fornecimento de probiótico no desempenho zootécnico, composição corporal, *burst* respiratório e aspectos hematológicos de *C. undecimalis* criados em tanque-rede no complexo estuarino de Cananéia-Iguape.
- Avaliar os efeitos da oferta de probiótico como aditivo alimentar (três concentrações em regime contínuo de fornecimento) no desempenho zootécnico, na composição corporal e no *burst* respiratório de *Astyanax* sp. 1 e avaliar o efeito da inclusão de duas concentrações de probiótico na água de transporte dos peixes para serem comercializados como isca-viva.

4. REFERÊNCIAS

ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. 2009 Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Brazilian Journal of Biology*, 69(4): 1133-1139.

ALIAUME, C.; ZERBI, A.; JOYEUX, J.C.; MILLER, J.M. 2000 Growth of juvenile *Centropomus undecimalis* in a tropical island. *Environmental Biology of Fishes*, 59(3): 299-308.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. 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): 128-136.

AUSTIN, B. and AUSTIN, D.A. 2007 *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. 4^a ed. Chichester, UK: Praxis Publishing. 552p.

BABIOR, B.M. 1988 The respiratory burst oxidase. *Basic Life Science*, 49: 815-821.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; GIRON, O.; MUZQUIZ J.L. 2007 Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(1): 185-193.

BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; CORREA, B.S.; MOURINO, J.L.P.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R., 2011 Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4): 795-801.

BERTACO, V.A. and GARUTTI, V. 2007 New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: *Characidae*). *Neotropical Ichthyology*, 5(1): 25-30.

BOLS, N.C.; L. BRUBACHER; R. GANASSIN; LEE, E.J. 2001 Ecotoxicology and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 853-873.

BOMBA, A.; NEMCOVÁ, R.; MUDROŇA, D.; GUBA, P. 2002 The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 13(4): 121-126.

BOYD, C.E. and MASSAUT, L. 1999 Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engeneering*, 20: 113-132.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura-MPA. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura*. 2010 Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletimestatistico-da-pesca-eaicultura-2010>>. Acesso em: 24 jan. 2011.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. 2007 *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Série livros 23. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 195p.

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

CARVALHO-FILHO, A. 1992 *Peixes: costa brasileira*. São Paulo: Editora Marca D'água. 320p.

CAVALLI, R. O. e HAMILTON, S. 2009 Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, (6): 64-69.

CEAGESP-Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo. 2013 Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/cotacoes/index_html?consultar=Consultar&b_start:int=40&grupo=6&data=15/05/2013&grupo_nome=Pescado> Acesso em: 15 mai. 2013.

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F.A.; GONZÁLES, P.; MESEQUER, J.; ESTEBÁN, M.A. 2012 Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(2): 342-349.

CERQUEIRA, V.R. 2005 Cultivo do robalo-peva, *Centropomus parallelus*. In: BALDISSEROTO, B. e LEVY, G. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora da UFSM. 403-431.

CERQUEIRA, V.R. 2010 Seleção de bactéria como probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(1): 17-24.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. 2003 Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco Ativa™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) in winter. *Fish and Shellfish Immunology*, 14(4): 333-345.

CORRÊA, C.F.; NOFFS, A.P.; LEONARDO, A.F.G.; BERTINI, G. 2010 O robalo no rio Ribeira e sua relação com as comunidades ribeirinhas. In: SILVA, R.B. (Ed.). *Alternativas de uso e manejo sustentável dos recursos agroambientais no Vale do Ribeira*. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel-ME. p.11-25.

DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C.F.; BORDON, I.C.A.C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2012 Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1): 40-45.

DIAZ-ROSALES, P.; SALINAS, I.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, A.; CHABRILLON, M.; BALEBONA, M.C. 2006 Gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(4): 482-492.

DIXON, D.A. 1991 Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; JASPERS, E.; OLLEVIER, F. Larvi'91. Symposium on fish and crustacean. *European Aquaculture Society*. Special Publication, 15, p. 184.

FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals: a review. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

GARUTTI, V. 2003 *Piscicultura ecológica*. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP. 69p.

GARUTTI, V. e BRITSKI, H.A. 2000 Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Séries Zoologia*, Porto Alegre, 13: 65-88.

GARUTTI, V. and LANGEANI, F. 2009 Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 7(3): 371-376.

HOLZAPFEL, W.H. and SCHILLINGER, U. 2002 Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35(2-3): 109-116.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. 2008 Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(9): 1201-1207.

KENNEDY, S.B.; TUCKER JR., J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER, V.R.; JARRELL, J.L.; SENNETT, D.G. 1998 Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 62(2): 573-588.

MACHADO, M.R.F. 2011 *Caracterização morfológica e bioquímica do sistema digestório e identificação por isótopos estáveis de robalo-peva e flecha selvagens e de cativeiro*. Jaboticabal. 87p. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura). Disponível em: < http://www.caunesp.unesp.br/publicacoes/dissertacoes_teses/teses/Tese%20Marcia%20Regina%20Fragoso%20Machado.pdf > Acesso em: 12 abr. 2012.

MENDONÇA, J.T. 1998 *A Pesca na Região de Cananéia - SP, nos anos de 1995 e 1996*. São Paulo. 137p. (Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo).

MENDONÇA, M.C.F.B. 2004 *Autoecologia do camorim, Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), (Perciformes: Centropomidae) em ambiente hipersalino em Galinhos, RN. Brasil. São Carlos. 145p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos).

NAVARRO, R.D.; MATTA, S.L.P.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.L.; RODRIGUES, S.S.; SILVA, R.F.; CALADO, L.L.; RIBEIRO FILHO, O.P. 2006 Níveis de energia digestível na dieta de piauçu no desenvolvimento testicular em estágio pós-larval. *Zootecnia Tropical*, 24(2): 153-163.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. 2002 Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(1): 1-21.

OYAKAWA, O.T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. 2006 *Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do vale do rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo*. São Paulo: Editora Neotropica. 201p.

PANCHENIAK, E.F.R. 2005 *Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de lactobacillus reuteri LPB P01-001 em suínos*. Curitiba. 154p. (Tese de Doutorado. Centro de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná). Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/3099/TESE%20DE%20DOUTORADO-PANCHENIAK.pdf;jsessionid=4F44BE52AFDE5B1AA933592F54BE0C55?sequence=1>> Acesso em: 15 abr. 2013.

PATERSON, B.D.; RIMMER, M.A.; MEIKLE G.M.; SEMMENS, G.L. 2003 Physiological response of the Asian sea bass, *Lates calcarifer*, to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, 218(1-4): 717-728.

RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. 2008 Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile sea bass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research*, 39(2): 134-143.

RIVAS, L.R. 1986 Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 1(3): 579-611.

ROMAGOSA, E.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; NARAHARA, M.Y. 2000 Desova e fecundidade da tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Mugilidae) na região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil (25°01'S; 47°57'W). *Atlântica*, 22: 5-12.

ROUBACH, R.; CORREIA E.S.; ZAIDEN, S.; MARTINO R.C.; CAVALLI R.O. 2003 Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, 34(1): 28-35.

SAMPAIO, L.A.; ROBALDO, R.B.; BIANCHINI, A. 2008 Hormone induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquaculture Research*, 39(7): 712-717.

SANCHES, E.G. e CERQUEIRA, V.R. 2011 Preservação de sêmen refrigerado de cioba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(12): 1673-1680.

SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. 2009 Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10(1): 198-209.

SANTOS, A.A.; GUTIERRE, R.C.; ANTONIAZZI, M.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA, M.R.R.; OSHIMA, C.T.F.; EGAMI, M.I. 2011 Morphocytochemical, immunohistochemical and ultrastructural characterization of the head kidney of fat snook (*Centropomus parallelus*). *Journal of Fish Biology*, 79(7): 1685-1707.

SCHREZENMEIR, J. and DE VRESE, M. 2001 Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 361-364.

SILVA, N.J.R.; LOPES, M.C.; FERNANDES, J.B.K.; HENRIQUES, M.B. 2011 Caracterização dos sistemas de criação e cadeia produtiva do lambari no Estado de São Paulo, Brasil. *Informações Econômicas*, 41(9): 17-28.

SOLIGO, T.A.; FERRAZ, E.M.; CERQUEIRA, V.R.; TSUZUKI, M.Y. 2008 Primeira experiência de indução hormonal, desova e larvicultura do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil. In: CYRINO, J.E.P.; SCORVO FILHO, J.D.; SAMPAIO, L.A.; CAVALLI, R.O. *Tópicos especiais em biologia aquática e Aquicultura*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.143-152.

SON, V.M.; CHANG, C.C.; WU, M.C.; GUU, Y.K.; CHIU, C.H.; CHENG, W. 2009 Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(5): 691-698.

SOUZA, R.M; MOURIÑO, J.L.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. 2010 Seleção de bactéria como probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva. *Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo*, 36(1): 17-24.

SOUZA-FILHO, J.J. e CERQUEIRA, V.R. 2003 Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(11): 1317-1322.

SUSSEL, F.R. 2012 *Fontes e níveis de proteína na alimentação do lambari-dorabo-amarelo: desempenho produtivo e análise econômica*. Pirassununga. 105p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-18032013-133242/pt-br.php>> Acesso em: 12 jun. 2013.

TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2004 *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144p.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-671.

VINE, N.G.; WINSTON D.L.; HORST K. 2006 Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3): 404-427.

VOLPE, A.V. 1959 Aspects of the biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), of southwest Florida. *Florida State Board of Conservation Technical Series*, 31(2): 37p.

VON IHERING, R. 1932 Criação de peixes em viveiros no Recife. *Boletim da Secretaria de Agricultura e Indústrias*, 35: 35-40.

WANG, Y. 2007 Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1-4): 259–264.

CAPÍTULO 1

Probiótico na alimentação de robalo-flecha criado em tanque-rede no estuário de Cananéia-Iguape

Resumo: Objetivou-se avaliar a influência da bactéria probiótica *Bacillus subtilis* no desempenho zootécnico, na composição corporal, na imunidade e nos aspectos hematológicos de juvenis de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, criados em tanques-rede em ambiente estuarino, quando ofertada como um aditivo alimentar em esquema de fornecimento contínuo ou alternado. O experimento foi realizado no complexo estuarino de Cananéia-Iguape, SP, Brasil. Foram utilizados 12 tanques-rede de 1,0 m³. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições. A concentração de *B. subtilis* foi de 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de ração. O Controle não recebeu probiótico, o Tratamento 1 recebeu probiótico em regime alternado de sete dias e no Tratamento 2 o fornecimento foi em regime contínuo. Foram estocados em cada tanque-rede cinquenta e cinco peixes com médias de comprimento de 5,90 ± 0,88 cm e de peso de 1,92 ± 0,28 g e alimentados por 191 dias. Foram realizadas análises zootécnicas, bromatológicas, hematológicas e imunológicas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de significância. Não houve diferenças significativas nos índices zootécnicos e na composição corporal dos peixes tratados em relação ao controle. Os peixes do Tratamento 1 demonstraram incremento no *burst* respiratório e menor contagem total de eritrócitos em relação aos outros tratamentos, enquanto que os peixes do regime contínuo não diferiram do controle nesses dois parâmetros analisados. O uso de 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ da bactéria *Bacillus subtilis* como aditivo na ração do robalo- flecha criado em tanques-rede em ambiente estuarino não pôde ser considerado como promotor de crescimento, mas funcionou como imunoestimulante, quando adotado o regime alternado de fornecimento. Mais pesquisas se fazem necessárias para a determinação da bactéria ideal e das dosagens e regimes de fornecimento adequados para a espécie.

Palavras-Chave: *Centropomus undecimalis*, *Bacillus subtilis*, piscicultura marinha, imunoestimulante, *burst* respiratório

Abstract: This study aimed to evaluate the influence of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* as food additive on growth performance, body composition, immunity and hematological parameters of juvenile common snook, *Centropomus undecimalis*, raised in net-cages at estuarine environment. The probiotic was offer in continuum and alternate schedule of feeding. The experiment was conducted in the estuarine environment of Cananéia-Iguape, SP, Brazil. Twelve net-cages (1.0 m³) in a completely randomized design with three treatments and four replications were used. The concentration of *B. subtilis* was 5 x 10⁹ CFU kg⁻¹ of ration. The control group did not receive the probiotic; Treatment 1 group received the probiotic at alternating feeding schedule (seven days with probiotic and seven days without probiotic, subsequently until the end of experiment) and Treatment 2 received the probiotic continuously. The stoking density utilized was 55 fish per net-cage, with a mean length of 5.90 ± 0.88 cm and mean weight of 1.92 ± 0.28 g. Fish were fed during 191 days. Zootechnical, bromatological, hematological and immunological analyses were conducted. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey's test at 5% significance. There was no significant difference at zootechnical indexes and body composition between fishes treated and control. Fish from the treatment 1 showed an increase in the respiratory burst values and lower erythrocyte count compared to the other treatments, while the fish from the continuous system did not differ from the control in these analysis. The administration of 5 x 10⁹ CFU kg⁻¹ of *B. subtilis* in snook raised in the estuarine environment could not be considered as a growth promoter, but promote an immunostimulant effect, when fed with alternate schedule

Key-Words: *Centropomus undecimalis*, *Bacillus subtilis*, marine fish farming, immunostimulant, respiratory burst

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos podem ser definidos como preparações microbianas vivas que promovem melhorias na saúde e no bem estar dos hospedeiros (GATESOUBE, 1999; VERSCHUERE *et al.*, 2000; SCHEREZENMEIR and DE VRESE, 2001). Trabalhos recentes têm estudado o seu uso na aquicultura (BALCÀZAR *et al.*, 2007; WANG, 2007; ALY *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2012) e na piscicultura marinha (CARNEVALI *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2011; CAVALLI e HAMILTON, 2009; SON *et al.*, 2009). Para Jatobá *et al.* (2008), o uso de probióticos pode ser uma alternativa viável para a diminuição do uso de quimioterápicos em criações de organismos aquáticos.

De acordo com Aly *et al.* (2008), o *Bacillus subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e demonstrou capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens* e na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) estimulou a imunidade e foi eficaz como promotor de crescimento nos animais tratados quando comparados ao controle. DIAS *et al.* (2012) reportaram incremento na capacidade reprodutiva e na atividade fagocítica de reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*) alimentados com ração adicionada de *B. subtilis* na concentração de 10^{10} UFC kg⁻¹.

Kennedy *et al.* (1998), analisando o balanço microbiano em larvas de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), verificaram exclusão de certas populações de vibrios, melhores taxas de sobrevivência e incremento na capacidade imunológica dos animais tratados com uma cepa de *B. subtilis* isolada da própria espécie, quando comparados aos peixes controle.

A forma de administração, a duração e o regime de fornecimento de probióticos aos peixes ainda precisam ser devidamente estudados para que sejam definidas estratégias ideais para cada espécie e condições de criação (NAYAK, 2010). Para Merrifield *et al.* (2010), existem apenas duas formas viáveis de fornecimento: via água ou via alimentação. Além disso, sugerem três regimes de fornecimento: aplicações de curto prazo, somente quando necessário; fornecimento alternado de curto prazo com e sem o preparado microbiano e regime de aplicações contínuas.

O robalo é atualmente o peixe de maior valor no mercado varejista de São Paulo (CEAGESP, 2013) e a depleção de seus estoques naturais já foi relatada no estuário de Cananéia-Iguape por Mendonça (1998) e na Flórida por Volpe (1959).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da oferta da bactéria probiótica *B. subtilis* como aditivo alimentar, em regime alternado e contínuo, no desempenho zootécnico, na composição corporal, na imunidade e nos aspectos hematológicos de juvenis de robalo-flecha (*C. undecimalis*) criados em tanques-rede em ambiente estuarino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e período experimental

O experimento foi conduzido no complexo estuarino de Cananéia-Iguape, no município de Ilha Comprida-SP, Brasil. (Figura 1) A região abrange grandes áreas conservadas de manguezais, recebendo influência de águas marinhas e continentais, proveniente do aporte fluvial do rio Ribeira de Iguape e outros cursos d'água. Durante o ano, a salinidade pode variar de 0 a 22 ppm, dependendo da intensidade pluviométrica (DAEE, 2011). O período experimental foi de 191 dias, de junho a dezembro de 2012.

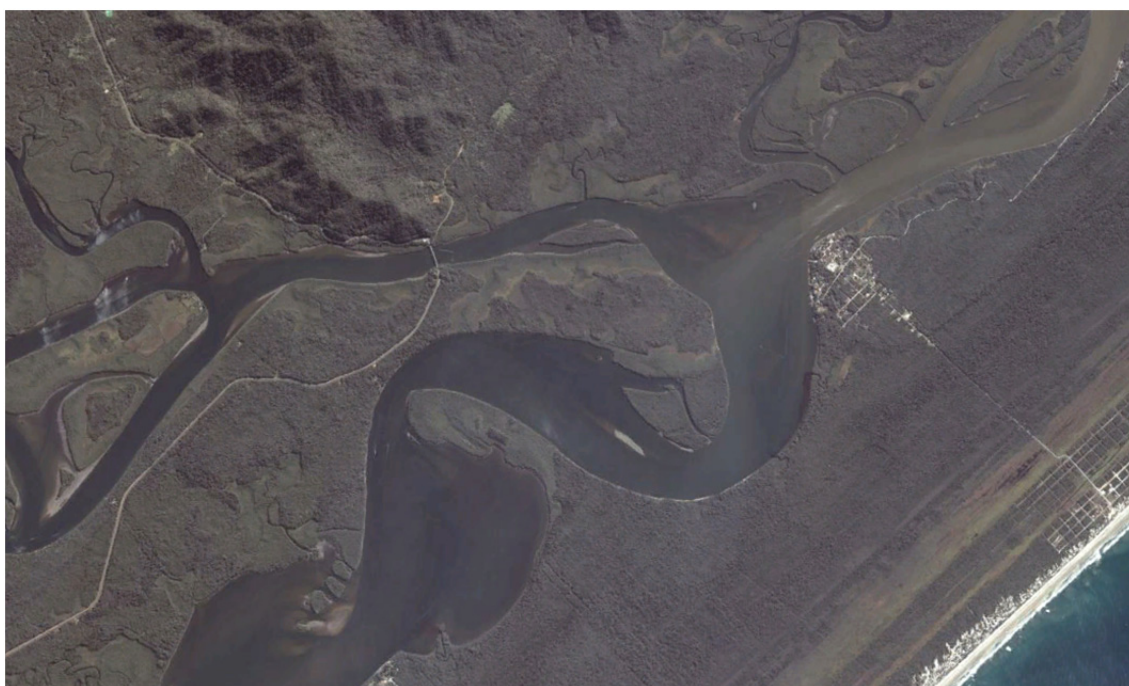


Figura 1. Local do experimento: Pedrinhas, Ilha Comprida-SP, Brasil

2.2. Desenho experimental e peixes

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições. Foram utilizados 12 tanques-rede de 1,0 x 1,0 x 1,3 m, com malha de 5,0 x 5,0 mm, instalados em três estruturas flutuantes de 2,7 x 3,0 m, construídas em madeira com flutuadores de garrafas PET reutilizadas. O volume útil de cada tanque experimental foi de 1,0 m³ (Figura 2).



Figura 2. Tanques-rede experimentais instalados em flutuadores de madeira e garrafas PET

Os juvenis de robalo-flecha, provenientes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, foram transportados em sacos de polietileno com oxigênio e aclimatados no local do experimento por 45 dias. Foram estocados 55 peixes em cada tanque-rede, com médias de comprimento de $5,90 \pm 0,88$ cm e peso de $1,92 \pm 0,28$ g, e alimentados duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

2.3. Dietas experimentais

As dietas foram preparadas com ração comercial para peixes, em pó (Tabela 1), umedecida com água na proporção 2:1, peletizada em máquina peletizadora experimental, seca até atingir 12% de umidade, triturada em 1,0; 2,0; e 4,0 mm em função do tamanho dos peixes ao longo do experimento e aspergida com 2% de óleo de soja. Esta ração foi considerada como dieta controle. A dieta contendo probiótico foi preparada com a mesma ração, entretanto, logo após a aspersão do óleo de soja, o *B. subtilis* liofilizado (cepa C-3102) foi incorporado diretamente aos peletes, na concentração de $5,0 \times 10^9$ UFC kg⁻¹ de ração. As dietas foram preparadas mensalmente e armazenadas em temperatura de 3 a 7 °C.

Tabela 1. Níveis de garantia da composição da ração fornecida aos robalos-flecha durante 191 dias

Níveis de garantia da ração		
Umidade (máx.)	%	12,0
Proteína bruta (mín.)	%	45,0
Extrato etéreo (mín.)	%	8,5
Fibra bruta (máx.)	%	4,5
Matéria mineral (máx.)	%	14,0
Cálcio (mín.)	%	1,5
Cálcio (máx.)	%	3,8
Fósforo (mín.)	%	1,0

Os peixes do tratamento controle (Controle) receberam a dieta sem probiótico. Os peixes do tratamento 1 (T1), em regime alternado de fornecimento, receberam a dieta com probiótico alternadamente à dieta controle (sete dias com probiótico, sete dias sem, sucessivamente). Os peixes do tratamento 2 (T2), em regime contínuo, receberam a ração com probiótico continuamente.

A duração da administração do probiótico no regime alternado de fornecimento foi determinada em função de dados de um estudo piloto conduzido por Santos (comunicação pessoal), realizado em laboratório com juvenis de robalo-peva (*C. parallelus*). Foi constatado que, durante o fornecimento contínuo de *B. subtilis* na alimentação, a atividade fagocítica foi crescente até os sete dias, sendo que, após este período, decresceu. Desta forma foi determinado que este dado poderia ser utilizado como

modelo para o fornecimento de probiótico em regime alternado de sete dias para *C. undecimalis*.

2.4. Análises

- Análise microbiológica das rações

Após as dietas serem preparadas e armazenadas por 31 dias, amostras de 100 g foram enviadas ao laboratório UNIQUÍMICA-LTDA, São Paulo-SP, para confirmação da concentração de *B. subtilis* adicionada à ração. As amostras foram homogeneizadas em solução salina estéril (32%) na proporção de 1:1 e levadas a banho-maria (65 °C) por 35 minutos. Após o resfriamento, foram realizadas quatro diluições seriadas (500 µL em 100 ml) e as amostras incubadas em meio TSB (Typical Soy Broth) a 37 °C por 24 horas. Então foi feita a verificação de presença de colônias de *B. subtilis* e, em caso afirmativo, suas contagens.

- Índices zootécnicos

Os valores de comprimento total (CT), peso total individual (PT) e sobrevivência ($S = \{N^{\circ} \text{ final} \times 100\} / N^{\circ} \text{ inicial}$) foram mensurados durante as biometrias inicial, intermediária (87 dias) e final (191 dias). Os valores de conversão alimentar aparente (CAA=consumo de ração/ganho de peso) foram obtidos a partir dos dados de fornecimento de ração, ganho em peso médio (GP = peso final-peso inicial) e sobrevivência (S) de cada repetição. Foram calculados os valores de fator de condição (K) de Fulton (Le CREN, 1951) e a taxa de crescimento específico (TCE = $\{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{tempo}\} \times 100$) (Figura 3).

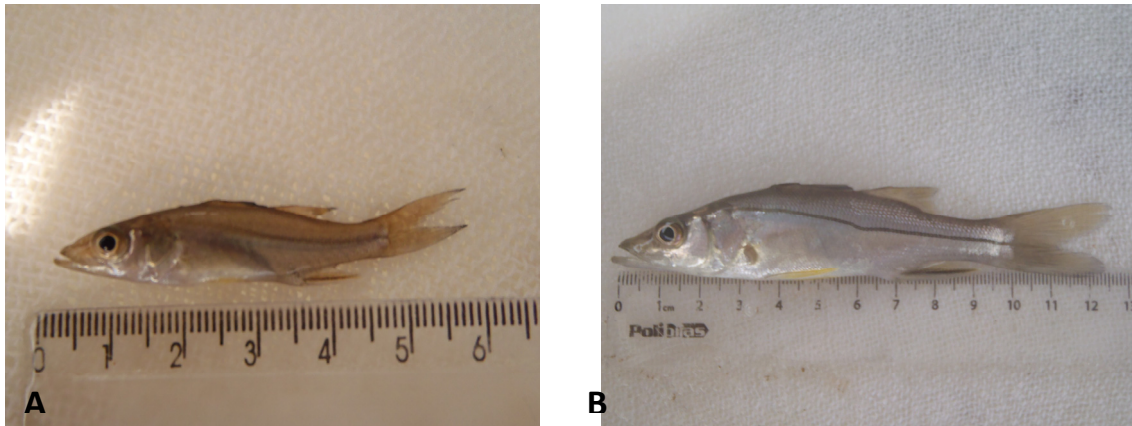


Figura 3. Biometrias inicial (A) e final (B) de *C. undecimalis*, criado em tanque-rede em ambiente estuarino na região de Cananéia-Iguape

- Composição corporal

Ao final do desafio alimentar, dois peixes de cada parcela, foram mortos por sedação profunda em solução de benzocaína, na concentração de 100 mg L⁻¹ (COYLE *et al.*, 2004) e posterior secção medular, identificados, congelados inteiros e enviados ao Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL/SAA-SP para realização das análises da composição corporal. As amostras coletadas de cada tratamento foram trituradas e homogeneizadas para determinação de umidade (105°C até peso constante), extrato etéreo (Soxhlet), proteína bruta (Kjeldhal N x 6,25) e cinzas (mufla 550°C) de acordo com os métodos propostos pela AOAC (1984).

- Análises hematológicas

Após 191 dias de alimentação, cinco peixes de cada tratamento foram anestesiados em benzocaína (COYLE *et al.*, 2004) e o sangue coletado por punção do vaso caudal com seringas heparinizadas (Figura 4). Imediatamente após a colheita, o sangue foi utilizado para determinação de: número de eritrócitos (RBC), contados em câmara de Neubauer; hematócrito (Ht), pelo método do microhematócrito; concentração de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina; preparação de extensões sanguíneas, posteriormente coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947), para contagem diferencial e total de leucócitos e contagem de trombócitos, pelo método indireto, segundo Hrubec e Smith (1998). Foram calculados os índices eritrocitários: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

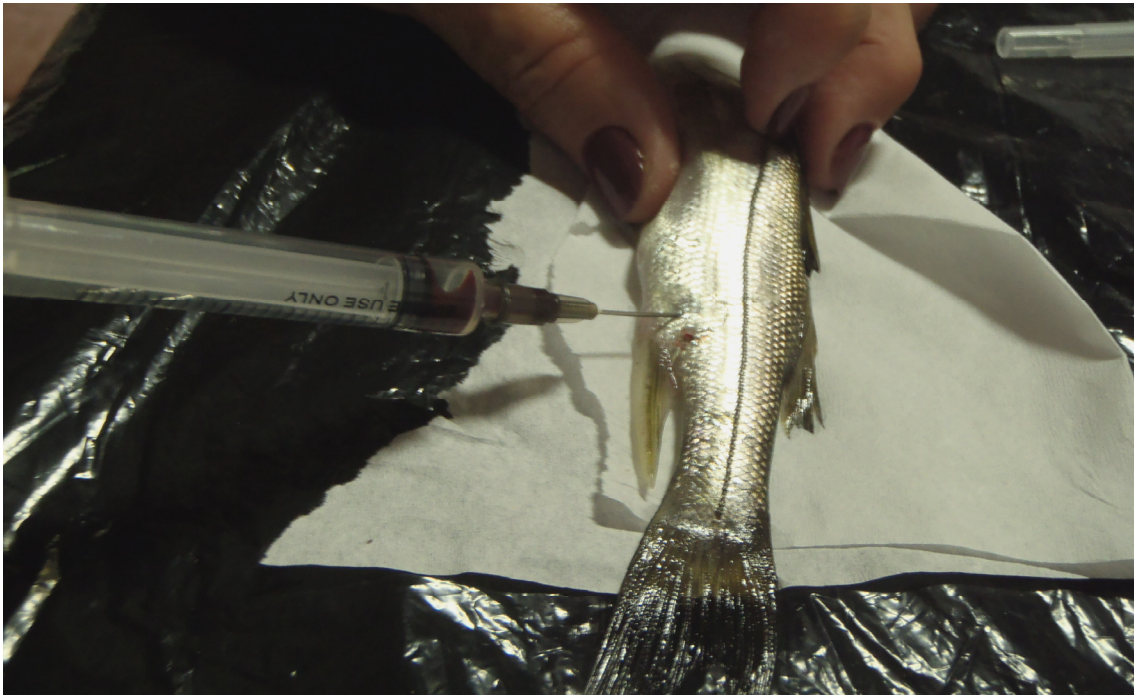


Figura 4. Coleta de sangue de *C. undecimalis* criado em tanque-rede em ambiente estuarino na região de Cananéia-Iguape

Burst respiratório

Ao término da coleta de amostras sanguíneas, os mesmos cinco peixes de cada tratamento foram mortos por sedação profunda em solução de benzocaína, na concentração de 100 mg L^{-1} (COYLE *et al.*, 2004), seguidas por secção medular. Foram extraídos os rins cefálicos, macerados com êmbolo de seringa em tela com malha de $50 \mu\text{m}$ e diluídos em meio de cultura RPMI-1640, com 20% de soro fetal bovino, 0,5% de glutamina e antibiótico. Em câmara de Neubauer foram contados os fagócitos de uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ desta mistura e então a diluição foi ajustada com o mesmo meio de cultura para atingir 1×10^7 fagócitos μL^{-1} . A diluição ajustada foi incubada por duas horas em microplacas de 96 poços ($400 \mu\text{L}$), sendo que cada amostra foi realizada em duplicata. Após este período, o sobrenadante foi descartado e cada amostra recebeu $100 \mu\text{L}$ do meio RPMI e novamente o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado em cada poço $100 \mu\text{L}$ de solução com NBT (nitroazul de tetrazólio), PMA (acetato miristato de forbol) e meio RPMI e a placa foi incubada por mais uma hora para que as células fagocitassem o NBT. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com $100 \mu\text{L}$ de PBS (tampão fosfato salino). Foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de metanol 70% aos poços para que houvesse a lise dos macrófagos e assim a liberação dos grânulos de formazan. Cento e vinte μL de KOH 2M mais $140 \mu\text{L}$ de DMSO (Dimetil Sulfóxido) foram adicionados aos poços

para que houvesse solubilização do precipitado. A placa foi inserida em espectrofotômetro e a absorbância lida em comprimento de onda de 630 nm.

- Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por teste de Tukey, sendo as diferenças consideradas significativas quando $P < 0,05$. Foi utilizado o software SAS (Statistical Analysis System). Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

As análises microbiológicas das dietas indicaram que houve recuperação da bactéria *B. subtilis* na mesma concentração adicionada à ração que recebeu probiótico (5×10^9 UFC kg^{-1}) e que não houve contaminação na ração do Controle.

O uso da bactéria probiótica *B. subtilis* como aditivo na alimentação do robalo-flecha não interferiu significativamente nos índices zootécnicos dos peixes tratados quando comparados ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Valores dos índices zootécnicos do robalo-flecha, *C. undecimalis*, criado em tanques-rede no estuário de Cananéia-Iguape, alimentado com ração sem probiótico (Controle) e adicionada de probiótico *B. subtilis*, em regime alternado (T1) e continuamente (T2), durante 191 dias

Tratamento	CT(cm)	PT(g)	GP(g)	CAA	TCE (%)	K	S (%)
Controle	9,7 \pm 0,9	7,9 \pm 1,1	6,0 \pm 1,1	15,4 \pm 3,8	0,73 \pm 0,7	0,87 \pm 0,1	68,6 \pm 11,3
T1	9,4 \pm 0,9	6,5 \pm 1,4	4,6 \pm 1,4	19,6 \pm 5,26	0,63 \pm 0,1	0,78 \pm 0,1	71,36 \pm 12,8
T2	10,1 \pm 0,7	8,7 \pm 1,5	6,8 \pm 1,5	12,6 \pm 1,77	0,78 \pm 0,1	0,83 \pm 0,1	70,90 \pm 18,8

CT= comprimento total; PT= peso total; GP= ganho em peso; CAA= conversão alimentar aparente; TCE= taxa de crescimento específico; K= fator de condição de Fulton (Le Cren, 1951); S= sobrevivência

Mesmo não havendo diferenças estatísticas, houve tendência de acréscimo no ganho em peso nos peixes do T2 após os 87 dias, se comparado aos peixes dos outros tratamentos (Figura 3). Nenhuma alteração significativa foi verificada nas variáveis de composição corporal entre os tratamentos (Tabela 3).

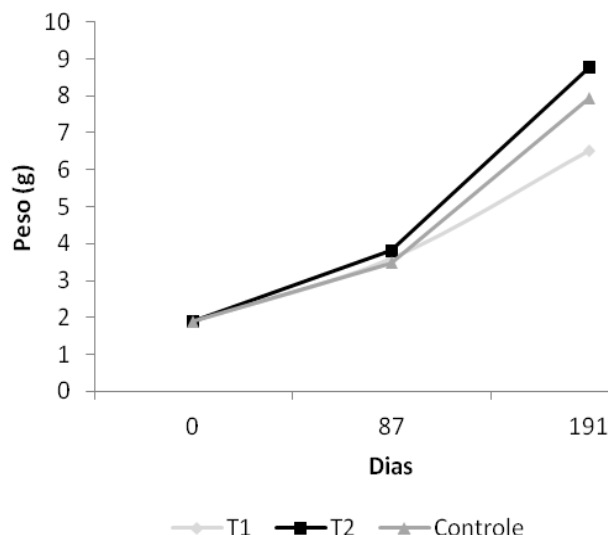


Figura 3. Pesos médios de robalo-flecha (*C. undecimalis*), criado em tanque-rede em ambiente estuarino na região de Cananéia-Iguape, alimentado com ração sem probiótico (Controle) e adicionada de probiótico *B. subtilis*, em regime alternado (T1) e continuamente (T2), durante 191 dias

Tabela 3. Valores em porcentagem das variáveis de composição corporal de robalo-flecha, *C. undecimalis*, criado em ambiente estuarino, na região de Cananéia-Iguape, alimentado com ração sem probiótico (Controle) e adicionada de probiótico *B. subtilis*, em regime alternado (T1) e continuamente (T2), durante 191 dias (n=8)

Tratamento	Umidade e Voláteis (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Gordura (%)
Controle	75,24	18,48	4,48	1,07
T1	75,46	17,43	5,41	0,73
T2	76,15	18,14	4,72	0,92

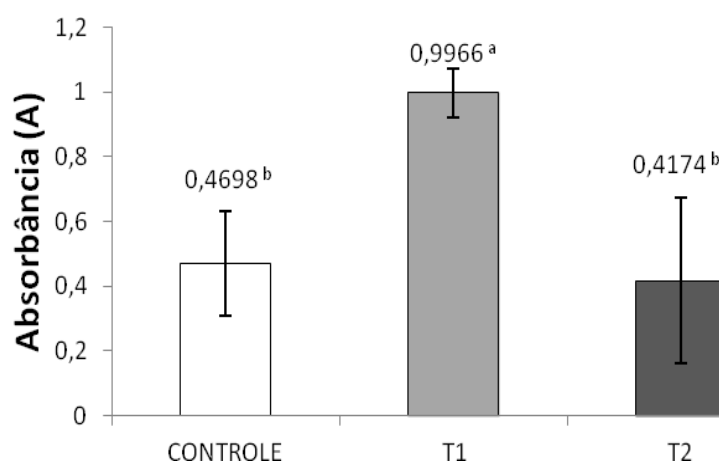
Dentre os parâmetros hematológicos, o RBC foi significativamente menor nos peixes de T1 (Tabela 4) quando comparado como os peixes dos outros tratamentos.

Foi verificado em T1 ($P < 0,05$) acréscimo significativo no *burst* respiratório em relação aos outros tratamentos, enquanto que não houve diferenças estatísticas entre o Controle e T2 (Figura 4).

Tabela 4. Valores do eritograma, leucograma e trombograma de robalo-flecha, *C. undecimalis*, criado em ambiente estuarino na região de Cananéia-Iguape, alimentado com ração sem probiótico (Controle) e adicionada de probiótico *B. subtilis*, em regime alternado (T1) e continuamente (T2), durante 191 dias (n=5)

	Controle	T1	T2
RBC ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	4,19 ± 0,33 ^a	3,5 ± 0,52 ^b	4,76 ± 0,6 ^a
Hemoglobina (g dL⁻¹)	5,99 ± 0,99	5,18 ± 0,33	5,16 ± 0,48
Leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	24,96 ± 27,1	24,07 ± 23,63	23,13 ± 7,37
Linfócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,57 ± 7,62	9,31 ± 14,50	9,74 ± 2,89
Neutrófilos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	12,49 ± 1,23	9,33 ± 7,73	10,63 ± 7,11
Monócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	5,89 ± 7,97	5,23 ± 6,77	2,66 ± 1,48
Trombócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	41,99 ± 24,1	32,28 ± 12,04	52,37 ± 18,07

^{ab} Letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05)



^{ab} Letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05)
n=5

Figura 4. Valores em absorbância (630 nm) do *burst* respiratório dos fagócitos ($10^7 \mu\text{L}^{-1}$) extraídos dos rins cefálicos de robalo-flecha, *C. undecimalis*, criado em ambiente estuarino na região de Cananéia-Iguape, alimentado com ração sem probiótico (Controle) e adicionada de probiótico, *B. subtilis*, em regime alternado (T1) e continuamente (T2), durante 191 dias (n=5)

4. DISCUSSÃO

A confirmação da bactéria nas análises microbiológicas da ração contendo probiótico indica que os bacilos permaneceram viáveis após o período de armazenamento e que a temperatura de 3 a 7°C foi eficiente para a conservação de ração adicionada de *B. subtilis*. Aly *et al.* (2008) encontraram maior quantidade de células viáveis nas dietas contendo *B. subtilis* armazenadas a 4°C quando comparadas às armazenadas a 25°C, no período de até quatro semanas, confirmando o observado no presente estudo.

A ausência de diferenças significativas para os índices zootécnicos obtidos neste trabalho pode estar relacionada com a falta de especificidade do bacilo em relação a digestibilidade e absorção de nutrientes em *C. undecimalis*. Kennedy *et al.* (1998) encontraram maior sobrevivência em larvas de *C. undecimalis* criadas em água contendo 10⁹ UFC ml⁻¹ de *B. subtilis* isolados da própria espécie quando comparado com os peixes do controle. Carnevali *et al.* (2006), testando a influência de probiótico em *Dicentrarchus labrax*, utilizando *L. delbrueckii delbrueckii* isolados do próprio *D. labrax*, registraram ganho em peso 81% maior nos peixes alimentados por 59 dias com o probiótico quando comparados ao grupo controle.

Os altos valores de conversão alimentar aparente podem estar relacionados com a forma peletizada da ração utilizada. Corrêa *et al.* (2010) encontraram altos valores de conversão alimentar (5,65) para juvenis de robalo-peva alimentados com ração semi-densa, que afunda lentamente, enquanto que Souza *et al.* (2011) encontraram menores valores (1,5 a 2,5) com ração extrusada, ambos com frequência alimentar de duas vezes ao dia.

As taxas de sobrevivência foram muito semelhantes entre os tratamentos. A situação de confinamento e a alta densidade de estocagem imposta aos peixes no experimento podem ter influenciado o comportamento agressivo da espécie e contribuído para o canibalismo acentuado verificado (Figura 5). Soligo *et al.* (2011) relataram taxas de sobrevivência em torno de 61% em experimento com juvenis de robalo-flecha, ressaltando que o canibalismo foi responsável por grande parte da mortalidade, assim como o ocorrido no presente estudo.

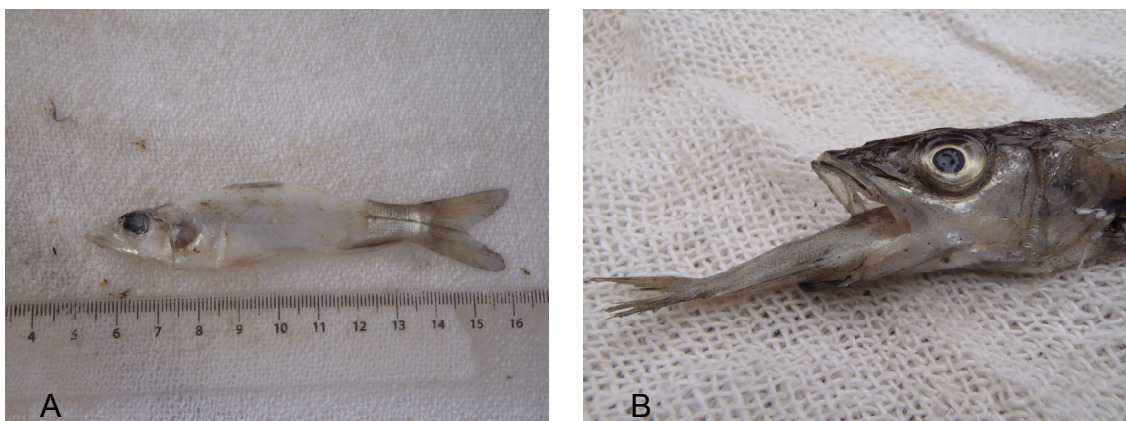


Figura 5. Sinais de canibalismo em *C. undecimalis* criado em ambiente estuarino na região de Cananéia-Iguape, encontrados durante o período experimental (**A:** *C. undecimalis* regurgitado após ser predado; **B:** *C. undecimalis* morto após predação de outro indivíduo)

Adams e Wolfe (2006) realizaram levantamento sobre canibalismo em robalos-flecha adultos, em ambiente natural. Concluíram que, em média, 3,6% dos animais coletados continham outros robalos-flecha em seus estômagos. Verificaram também que só houve canibalismo nos peixes capturados em baías protegidas, enquanto que não houve incidência nos animais capturados nas porções abertas do estuário, demonstrando que o confinamento é um fator agravante para a espécie.

Da mesma forma que o ocorrido neste trabalho, Barbosa *et al.* (2011) não verificaram diferenças estatísticas entre os valores dos índices zootécnicos e composição corporal dos robalos-peva do grupo controle e os tratados com *L. plantarum*. Apesar de não diferirem estatisticamente entre si, os valores dos parâmetros de composição corporal apontam leve decréscimo nos teores de proteína total e lipídeos, além de pequeno incremento na quantidade de cinzas dos peixes que receberam probiótico em regime alternado de fornecimento (T1). Isto sugere menor acúmulo de musculatura e gordura, o que também pôde ser verificado na análise de ganho em peso médio e no K dos peixes deste tratamento, indicando peixes com menor peso em relação ao comprimento.

O *burst* respiratório vem sendo comumente utilizado como parâmetro para dimensionar a resposta imune dos animais (COOK *et al.*, 2003; ABREU *et al.*, 2009; SON *et al.*, 2009; CERZUELA *et al.*, 2012). No presente estudo a análise do *burst* respiratório foi realizada com os fagócitos extraídos dos rins cefálicos dos peixes, em função destes órgãos terem sido classificados por Santos *et al.* (2011),

como a principal fonte de macrófagos em *C. paralellus* e um importante centro hematopoiético na espécie.

No presente estudo, os fagócitos dos peixes de T1 apresentaram maior atividade oxidativa durante o processo de fagocitose se comparados aos outros tratamentos, sugerindo que a administração de probiótico em regime alternado estimulou a atividade fagocítica dos animais. Geng *et al.* (2011) verificaram incremento no *burst* respiratório de bijupirá (*Rachycentron canadum*), alimentados com uma combinação de Quitosana e *B. subtilis* incluídos na ração, quando comparado com os peixes do controle, enquanto que Dias-Rosález *et al.* (2006) e Cerezuela *et al.* (2012) não encontraram diferenças estatísticas entre *Sparus aurata* tratados com probióticos e os peixes do controle.

A administração em regime contínuo pode ter provocado redução na atividade imunológica em *C. undecimalis*, sendo que nos peixes do T2, mesmo não havendo diferenças estatísticas, proporcionou níveis mais baixos na atividade oxidativa dos fagócitos dos rins cefálicos do que os verificados no Controle. Segundo Merrifield *et al.* (2010), o uso contínuo de imunoestimulantes em peixes pode causar diminuição na atividade imunológica, podendo levar, em alguns casos à imunossupressão. Entretanto, Balcázar *et al.* (2007) recomendaram para truta marrom (*Salmo trutta*) que as próximas pesquisas se concentrem em aplicações contínuas, por longos períodos, para que possa haver um balanço entre os microorganismos probióticos e a microbiota intestinal do hospedeiro.

Dentre os valores hematológicos, o RBC foi o único que apresentou diferenças entre os tratamentos, sendo menor em T1. Os eritrócitos são as células sanguíneas que contém hemoglobina, pigmento do sangue que é responsável pelo transporte de O₂ e CO₂. Qualquer deficiência nos eritrócitos será traduzida por uma falta de O₂ nos tecidos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Esta diferença no número de eritrócitos pode estar relacionada com as diferentes respostas imunológicas que os peixes dos tratamentos enfrentaram. Fujimoto *et al.* (2009) encontraram valores de número eritrocitário superiores aos verificados no presente estudo (entre 5 e 6 x 10⁶ µL), entretanto, os dados foram coletados em robalos-flecha de vida livre, podendo justificar as diferenças.

Dentre os leucócitos, os neutrófilos foram com mais frequência encontrados no sangue periférico, ocorrendo entre 35 e 50%, seguido por linfócitos e monócitos, diferentemente do relatado por Fujimoto *et al.* (2009), que verificaram maiores porcentagens de linfócitos nas contagens em robalo-flecha adultos. Os valores absolutos de leucócitos não foram diferentes significativamente nos peixes dos tratamentos. A contagem total de trombócitos, o número total de leucócitos, monócitos e neutrófilos foram superiores aos valores verificados por Ranzani-Paiva *et al.* (2008) em *C. parallelus* provenientes de tanques-rede, inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, os valores de linfócitos do presente estudo estão abaixo dos encontrados por Ranzani-Paiva *et al.* (2008) e por Barbosa *et al.* (2011), que encontraram médias de 50.300 mm^{-3} linfócitos em *C. parallelus* alimentados com probiótico e 35.000 mm^{-3} no grupo controle.

O número total de trombócitos foi superior ao verificado por Barbosa *et al.* (2011) em robalo-peva, que encontraram $6,8 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ nos peixes controle e $12,6 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ nos peixes tratados com *L. plantarum*. Os trombócitos de peixes teleósteos são células multifuncionais envolvidas no processo de coagulação do sangue e também parecem desempenhar um papel ativo na imunidade (MESEGUER *et al.*, 2002). Foi sugerido por Passantino *et al.* (2005) que trombócitos em peixes não são verdadeiras células fagocíticas e podem funcionar como uma interligação entre o sistema imune inato e o adaptativo.

5. CONCLUSÃO

O uso de $5 \times 10^9 \text{ UFC kg}^{-1}$ da bactéria *Bacillus subtilis* como aditivo alimentar na ração do robalo-flecha criado em tanques-rede em ambiente estuarino não pôde ser considerado como promotor de crescimento, não interferindo na composição corporal, mas atuando como imunoestimulante e diminuindo o RBC quando adotado o regime alternado de fornecimento. O *Bacillus subtilis* pode ser utilizado como bactéria probiótica em estudos posteriores com *C. parallelus*.

6. AGRADECIMENTOS:

Agradecimentos especiais ao CNPq, pelo financiamento do projeto, a Guilherme Silveira Telli, do Instituto de Pesca de São Paulo, pelas análises estatísticas, a André Koga do LIAH da UNASP pela ajuda com as análises do *burst* respiratório e ao técnico de campo Diógenes Dorta Filho, o Jorginho, pela manutenção e alimentação diária dos peixes.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. 2009 Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Brazilian Journal of Biology*, 69(4): 1133-1139.

ADAMS, A.J. and WOLFE, R. K. 2006 Cannibalism of juveniles by adult common snook (*Centropomus undecimalis*). *Gulf of Mexico Science*, 24(1-2): 11-13.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A., MOHAMED, M.F. 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): 128-136.

AOAC-Association of Official Analytical Chemists. 1984 *Official methods of analysis*. 12^a ed. Washington. 1015p.

BABIOR, B.M. 1988 The respiratory burst oxidase. *Basic Life Science*, 49: 815-821.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; GIRON, O.; MUZQUIZ J.L. 2007 Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(1): 185-193.

BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; CORREA, B.S.; MOURINO, J.L.P.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. 2011 Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. *Brazilian archives of biology and technology*, 54(4): 795-801.

BOLS, N.C.; L. BRUBACHER; R. GANASSIN; LEE, E.J. 2001 Ecotoxicology and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 853-873.

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

CAVALLI, R.O. e HAMILTON, S. 2009 Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, (6): 64-69.

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F.A.; GONZÁLES, P.; MESEQUER, J.; ESTEBÁN, M.A. 2012 Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(2): 342-349.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. 2003 Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco Ativa™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) in winter. *Fish and Shellfish Immunology*, 14(4): 333-345.

CORRÊA, C.F.; LEONARDO A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORREA Jr., L. 2010 Frequência alimentar para juvenis de robalo-peva criados em água doce *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias Ambientais*, 8(4): 429-436.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. 2004 *Anesthetic in aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication, 3900. Texas. 6p.

DAEE-Departamento de Águas e Energia Elétrica, 2011 *Sistematização de bases de dados ambientais do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape visando subsidiar a regra operativa da barragem do Valo Grande*. Iguape. 120p. Relatório técnico ambiental sobre o parecer das obras no Valo Grande, Iguape-SP.

DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C.F.; BORDON, I.C.A.C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2012 Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1): 40-45.

DIAZ-ROSALES, P.; SALINAS, I.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, A.; CHABRILLON, M.; BALEBONA, M.C. 2006 Gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(4): 482-492.

FUJIMOTO, R.Y.; SANTANA, C.A.; CARVALHO, W.L. C.; DINIZ, D.G.; BARROS, Z.M.N.; VARELLA, J. E. A.; GUIMARÃES, M. D. F. 2009 Hematologia e parasitas metazoários de camurim (*Centropomus undecimalis*, Bloch, 1792) na região Bragantina, Bragança-Pará. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35: 441-450.

GATESOUBE, F.J. 1999 The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2): 147-165.

GENG, X.; DONG, X-H.; TAN, B-P.; YANG, Q-H.; CHI, S-Y.; LIU, H-Y.; LIU, X-Q. 2011 Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth

performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunology*, 31: 400-406.

HRUBEC, T.C. and SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5ª ed. Blackburg: Wiley-Blackwell. p.1120-1125.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. 2008 Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(9): 1201-1207.

KENNEDY, S.B.; TUCKER Jr., J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER, V.R.; JARRELL, J.L.; SENNETT, D.G. 1998 Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 62(2): 573-588.

LE CREN, E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20(2): 201-219.

MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. 2010 The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2): 1-18.

MESEGUER, J.; ÀNGELES ESTEBAN, M.; RODRÍGUEZ, A. 2002 Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy Research and Technique*, 57: 491-497.

NAYAK, S.K. 2010 Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14.

PASSANTINO, L.; CIANCIOTTA, A.; PATRUNO, R.; RIBAUD, M.R.; JIRILLO, E.; PASSANTINO, G.F. 2005 Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 27: 345-356.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A.T. 2004 Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Editora Varela. p.89-120.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A.; DIAS, D.C.; SERIANI, R.; EGAMI, M.I. 2008 Hematological and phagocytic response of the fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. *Bioikos*, 22(1): 29-35.

ROSENFELD, G. 1947 Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. *Memórias do Instituto Butantan*, 20: 315-328.

SANTOS, A.A.; GUTIERRE, R.C.; ANTONIAZZI, M.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA, M.R.R.; OSHIMA, C.T.F.; EGAMI, M.I. 2011 Morphocytochemical, immunohistochemical and ultrastructural characterization of the head kidney of fat snook (*Centropomus parallelus*). *Journal of Fish Biology*, 79(7): 1685-1707.

SCHREZENMEIR, J. and DE VRESE, M. 2001 Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 361-364.

SOLIGO T.A.; GARCIA, A.S.; CERQUEIRA, V.R. 2011 Weaning of the common snook (*Centropomus undecimalis*) early juveniles reared in laboratory using commercial and experimental diets. *Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo*, 37(4): 367-374.

SON, V.M.; CHANG, C.C.; WU, M.C.; GUU, Y.K.; CHIU, C.H.; CHENG, W. 2009 Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(5): 691-698.

SOUZA, J.H.; FRACALLOSSI, D.M.; GARCIA, A.S.; RIBEIRO, F.F.; TSUZUKI, M.Y. 2011 Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo-peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações protéicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(2): 190-195.

TAVARES-DIAS, M; ONO, E.A.; PILARSKY, F.; MORAES, F.R. 2007 Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *Journal of Applied Ichthyology*, 23(6): 709-712.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-671.

WANG, Y. 2007 Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1-4): 259-264.

CAPÍTULO 2

Probiótico na alimentação e na água de transporte de lambari para ser comercializado como isca-viva

Resumo: Objetivou-se avaliar a influência do probiótico *Bacillus subtilis* como aditivo alimentar no desempenho zootécnico, no *burst* respiratório, na composição corporal do lambari, *Astyanax* sp.1, e verificar sua eficácia na resistência dos peixes se adicionado à água de transporte. O experimento foi realizado em 12 tanques-rede de 1,0 m³ instalados em um viveiro de 600 m². O delineamento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições. Os alevinos (3,0 ± 0,5 cm) foram estocados na densidade de 80 peixes m⁻³ e alimentados por 59 dias, sem probiótico (C), com 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ (T1) e com 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹ (T2) de *B. subtilis* nas dietas. Após o período de tratamento, os mesmos peixes foram submetidos ao teste de resistência ao transporte em sacos de polietileno na densidade de cinco peixes L⁻¹, com ou sem a adição de 0,5 x 10⁹ UFC L⁻¹ de *B. subtilis* na água, totalizando seis novos tratamentos com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de significância. O probiótico não interferiu nos valores dos índices zootécnicos e no *burst* respiratório, entretanto os peixes de T2 apresentaram maior acúmulo de proteínas e matéria seca na carcaça do que os peixes dos outros tratamentos. A oferta de 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de *B. subtilis* como aditivo alimentar aumentou o tempo de sobrevivência dos peixes nas embalagens e diminuiu a concentração de amônia total na água. A inclusão de 0,5 x 10⁹ UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte não demonstrou resultados satisfatórios. Para o transporte e comercialização desta espécie em sacos de polietileno, recomenda-se ofertar como aditivo alimentar 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de *B. subtilis* na ração dos peixes durante todo o ciclo produtivo. Este é o primeiro relato de estudo em cativeiro desta espécie.

Palavras-chave: *Astyanax* sp. 1, *Bacillus subtilis*, transporte de peixe, promotor de crescimento, imunostimulante, estresse

Abstract: This study aimed to evaluate the influence of the probiotic, *Bacillus subtilis*, as a feed additive on grow performance, respiratory burst and body composition of *Astyanax* sp.1, and also verify its effectiveness in the resistance of the fish when the probiotic is added to transport water. The experiment was carried out in 12 cages of 1.0 m³ installed in a tank of 600 m², in a completely randomized design with three treatments and four replications. The fingerlings (3.0 ± 0.5 cm) were stocked at 80 fish m⁻³ and fed for 59 days with no probiotic (C), with 5 x 10⁹ CFU kg⁻¹ (T1) and 10 x 10⁹ CFU kg⁻¹ (T2) of *B. subtilis* in the diets. After the 59 days of feeding, fish were submitted to transportation resistance challenge test in polyethylene bags at a density of five fish L⁻¹, with or without the addition of 0.5 x 10⁹ CFU L⁻¹ of *B. subtilis* in water, totaling six new treatments with four replications. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% significance. The probiotic did not affect the values of the growth performance and the respiratory burst, although the fish T2 showed higher accumulation of dry matter and protein than fish from other treatments. The administration of 5 x 10⁹ CFU kg⁻¹ of *B. subtilis* as a food additive increased the survival time of fish in transportation test and decreased the concentration of total ammonia in the water. The inclusion of 0.5 x 10⁹ CFU L⁻¹ of probiotic in water transport not showed satisfactory results. To transportation and marketing of this type in polyethylene bags, it is recommended offer 5 x 10⁹ CFU kg⁻¹ of *B. subtilis* in the diet of fish during the entire production cycle. This is the first report of raise and transporting of this species.

Key word: *Astyanax* sp. 1, *Bacillus subtilis*, fish transport, growth promoter, immunostimulant, stress

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos vêm sendo estudados na aquicultura como promotores de crescimento, imunostimulantes, redutores de estresse, substitutos aos tratamentos quimioterápicos, estimulantes reprodutivos e condicionadores de água de criação e transporte de peixes (BOYD and MASSAUT, 1999; CARNEVALI *et al.*, 2006; WANG, 2007; ALY *et al.*, 2008; RAJ *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2012; MOHAPATRA *et al.*, 2012.)

DIAS *et al.* (2012) observaram incremento na capacidade reprodutiva, na atividade fagocítica e na resistência ao estresse em reprodutores de matrinxã (*Brycon amazonicus*) alimentados com ração contendo *Bacillus subtilis*. Kennedy *et al.* (1998), em larvas de *Centropomus undecimalis*, verificaram exclusão de populações de víbrios, melhores taxas de sobrevivência e incremento na capacidade imunológica dos peixes tratados com uma cepa de *B. subtilis* isolada da própria espécie, quando comparados aos peixes controle.

As espécies de peixes nativas pertencentes ao gênero *Astyanax*, popularmente conhecidos como lambaris, possuem bons atributos zootécnicos, são bastante conhecidos e apreciados em todo o território nacional e possuem nichos mercadológicos ainda pouco explorados, como a produção para isca-viva (SUSSEL, 2012). Entretanto, as taxas de mortalidade durante o transporte e o período de armazenamento até a comercialização causam perdas para os comerciantes. De acordo com Lim *et al.* (2003), as embalagens de polietileno vêm sendo utilizadas com sucesso no transporte e comercialização de peixes vivos desde 1950. Raj *et al.* (2008) verificaram maiores taxas de sobrevivência em *Catla catla* tratadas com probiótico durante o transporte em sacos de polietileno. Na literatura, são raros os estudos envolvendo imunostimulantes ou probióticos em *Astyanax* (MIRANDA, 2012).

Os lambaris da espécie *Astyanax* sp. 1 ainda não foram classificados em revisões taxonômicas. O primeiro registro da espécie foi realizado por Oyakawa *et al.* (2006), em levantamento ictiológico nos riachos da Mata Atlântica. São peixes de pequeno porte que habitam rios, riachos e lagoas sempre em baixas altitudes (até 50 m), onde se alimentam de larvas terrestres e insetos que caem na superfície da água (OYAKAWA *et al.*, 2006). Atingem a primeira maturação sexual em aproximadamente 90 dias em condições de cativeiro, com oito

centímetros de comprimento para os machos, que apresentam espículas na nadadeira anal quando maduros sexualmente, e dez centímetros para as fêmeas, que demonstram o ventre abaulado em função da maturação dos ovócitos nas gônadas (observação pessoal). Estas características também podem ser observadas em *A. altiparanae* e *A. bimaculatus* (AGOSTINHO *et al.*, 1984; GARUTTI, 2003).

Com este trabalho objetivou-se avaliar diferentes concentrações de *B. subtilis* como aditivo alimentar no desempenho zootécnico, no *burst* respiratório e na composição corporal do lambari *Astyanax* sp.1 criado em cativeiro e verificar a eficácia do probiótico na resistência ao transporte e armazenamento dos peixes em sacos de polietileno para serem comercializados como isca-viva. Este é o primeiro relato de criação e transporte desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Primeira etapa: desafio alimentar, desempenho zootécnico, composição corporal e *burst* respiratório

2.1.1 Local do experimento e peixes

O estudo foi realizado na estação de piscicultura da APTA-Pólo Regional do Vale do Ribeira, no município de Pariquera Açú-SP, Brasil, entre janeiro e abril de 2013, em um viveiro escavado de 600 m².

Os alevinos de *Astyanax* sp. 1, com peso médio de 0,3 ± 0,1 g e comprimento médio de 3,0 ± 0,5 cm, provenientes de desova natural, foram estocados em 12 tanques-rede de 1,0 x 1,0 x 1,0 m, com malha de 5,0 x 5,0 mm, na densidade de 80 peixes m⁻³ (Figura 1). Foi montado um sistema de recirculação de água com bomba submersa dentro do viveiro, onde, em cada tanque-rede, foi disposta uma tubulação com torneira, responsável pelo controle da renovação de água, sendo taxa de renovação de água semelhante em todos os tanques-rede (200 L h⁻¹)

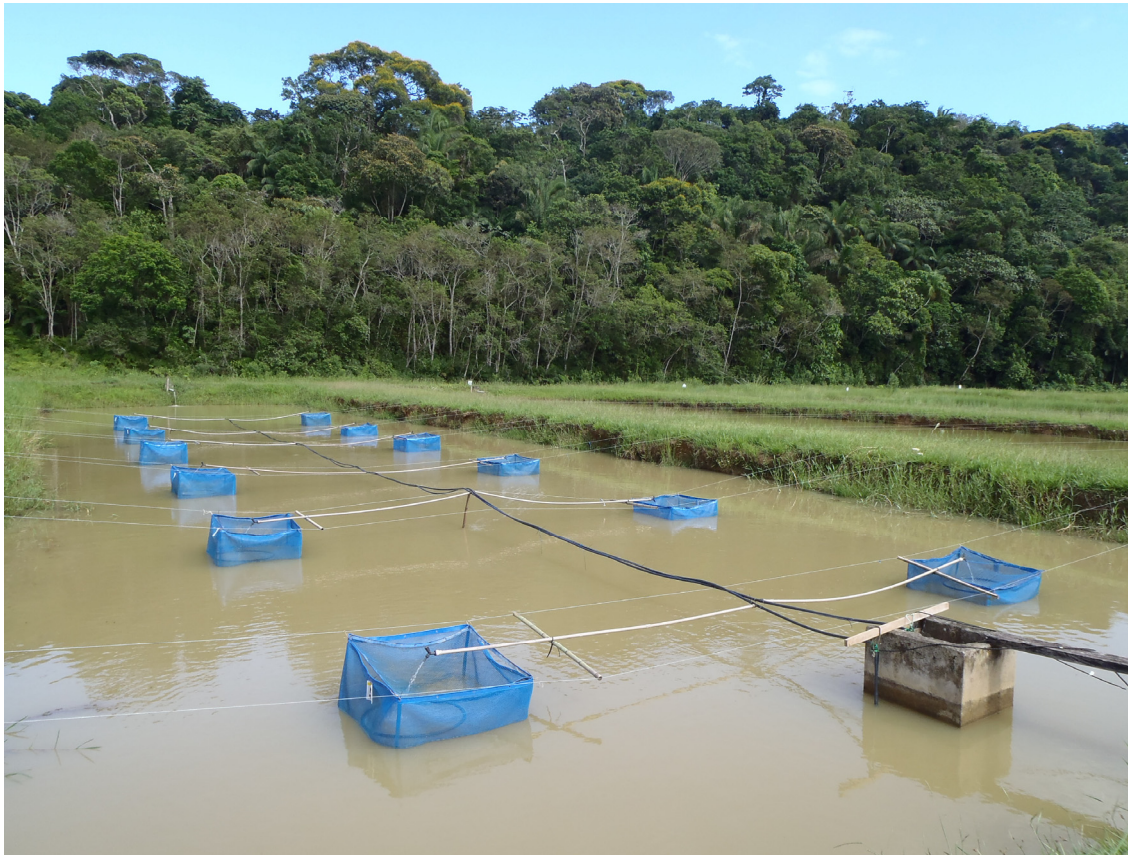


Figura 1. Local do experimento e disposição dos tanques-rede experimentais na criação de lambari *Astyanax* sp. 1

2.1.2. Delineamento e dietas experimentais

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições. Cada tanque-rede foi considerado como uma repetição. As dietas oferecidas aos peixes foram preparadas com ração comercial extrusada para peixes (Tabela 1), com peletes entre 2,0 e 2,8 mm, aspergida com 2% de óleo de soja. Esta ração foi considerada como dieta controle e foi oferecida aos peixes do tratamento C. As dietas contendo probiótico foram preparadas logo após a aspersion do óleo na ração. O *B. subtilis* (cepa C-3102) foi incorporado diretamente à ração, na concentração de 5×10^9 UFC kg^{-1} para o tratamento 1 (T1) e 10×10^9 UFC kg^{-1} para o tratamento 2 (T2). As dietas foram preparadas a cada 30 dias e armazenadas em temperatura de 3 a 7°C.

Tabela 1. Níveis de garantia da composição da ração fornecida aos lambaris *Astyanax* sp. 1 durante 59 dias

Níveis de garantia da ração		
Umidade (máx.)	%	11,0
Proteína bruta (mín.)	%	40,0
Extrato etéreo (mín.)	%	9,0
Fibra bruta (máx.)	%	4,0
Matéria mineral (máx.)	%	14,0
Cálcio (mín.)	%	1,5
Cálcio (máx.)	%	3,8
Fósforo (mín.)	%	0,1

Os peixes foram alimentados por 59 dias, duas vezes ao dia, até a saciedade aparente, às 09:00 e às 16:00 h.

2.1.3. Análises

- Análises químicas e físicas da água

As coletas de dados foram realizadas uma vez por semana, sempre no mesmo horário, às 9:00 horas, nas quais foram medidos, em campo, os valores de oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2\text{D L}^{-1}$) e temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) utilizando-se oxímetro digital YSI 550 A, e transparência da água (cm), por meio de disco de Secchi. Amostras de água foram coletadas com auxílio de garrafa de Van Dorn para determinação da alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3\text{ L}^{-1}$), por meio de titulação com ácido forte (GOLTERMAN *et al.*, 1978); potencial hidrogeniônico, com medidor de pH digital HANNA-21 e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), utilizando-se condutivímetro de bancada ADAMO C-150.

- Análise microbiológica das rações

Após as dietas serem preparadas e armazenadas por 31 dias, amostras de 100 g foram enviadas ao laboratório UNIQUÍMICA-LTDA, São Paulo-SP, para confirmação da concentração de *B. subtilis* adicionada à ração. As amostras foram homogeneizadas em solução salina estéril (32%) na proporção de 1:1 e levadas a banho-maria ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 35 minutos. Após o resfriamento, foram realizadas quatro diluições seriadas (500 μL em 100 mL de solução salina) e as amostras incubadas em meio TSB (Typical Soy

Broth) a 37 °C por 24 horas. Então foi feita a verificação de presença de colônias de *B. subtilis* e, em caso afirmativo, suas contagens.

- Índices zootécnicos

Os valores de comprimento total (CT), peso total (PT) e sobrevivência (S) foram mensurados durante as biometrias inicial e final (59 dias) (Figura 2). Os valores de conversão alimentar aparente (CAA = consumo de ração/ganho de peso) foram obtidos a partir dos dados de fornecimento de ração, ganho em peso médio (GP= peso final- peso inicial) e sobrevivência ($S = \{N^{\circ} \text{ final} \times 100\} / N^{\circ} \text{ inicial}$) de cada repetição. Foram calculados os valores de fator de condição (K) de Fulton (Le CREN, 1951) e a taxa de crescimento específico (TCE = $\{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{tempo}\} \times 100$)).

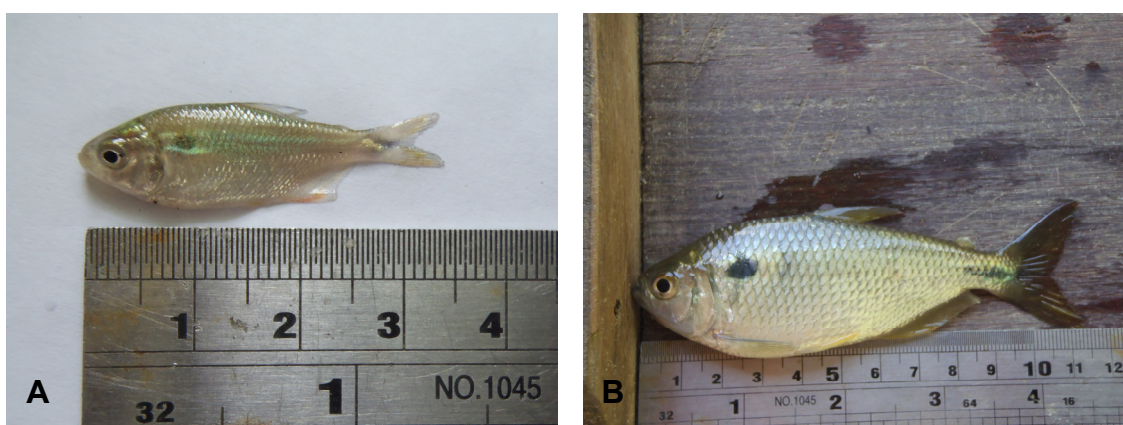


Figura 2. Biometrias inicial (A) e final (B) de *Astyanax* sp 1, utilizados em experimento com *B. subtilis*

- Composição corporal

Ao final do desafio alimentar, cinco peixes de cada repetição foram mortos por sedação profunda em solução de benzocaína, na concentração de 100 mg L⁻¹ (COYLE *et al.*, 2004) e posterior secção medular, identificados, congelados inteiros e enviados ao Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL/SAA-SP para realização das análises da composição corporal. As amostras coletadas de cada tratamento foram moídas, homogeneizadas e analisadas em triplicata para determinação de umidade (105°C até peso constante), extrato etéreo (Soxhlet), proteína bruta (Kjeldhal N x 6,25) e cinzas (mufla 550°C) de acordo com os métodos propostos pela AOAC (1984).

- *Burst* respiratório

Cinco peixes de cada repetição foram mortos por sedação profunda em solução de benzocaína, na concentração de 100 mg L⁻¹ (COYLE *et al.*, 2004). Foram extraídos os rins cefálicos, macerados com êmbolo de seringa em tela com malha de 50 µm (Figura 3) e diluídos em meio de cultura RPMI-1640, com 20% de soro fetal bovino, 0,5% de glutamina e antibiótico. Em câmara de Neubauer foram contados os fagócitos de uma alíquota de 1 µL desta mistura (Figura 3) e então a diluição foi ajustada com o mesmo meio de cultura para atingir 1x10⁷ fagócitos µL⁻¹. A diluição ajustada foi incubada por duas horas em microplaca de 96 poços (400 µL), sendo que cada amostra foi realizada em duplicata. Após este período, o sobrenadante foi descartado e cada amostra recebeu 100 µL do meio RPMI e novamente o sobrenadante foi descartado. Então foi adicionado em cada poço 100 µL de solução com NBT (nitroazul de tetrazólio), PMA (acetato miristato de forbol) e meio RPMI e a placa foi incubada por mais uma hora para que as células fagocitassem o NBT. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 100 µL de PBS (tampão fosfato salino). Foram adicionados 100 µL de metanol 70% aos poços para que houvesse a lise dos macrófagos e assim a liberação dos grânulos de formazan. Cento e vinte µL de KOH 2M mais 140 µL de DMSO (Dimetil Sulfóxido) foram adicionados aos poços para que houvesse solubilização do precipitado. A placa foi inserida em espectrofotômetro e a absorbância lida em comprimento de onda de 630 nm.

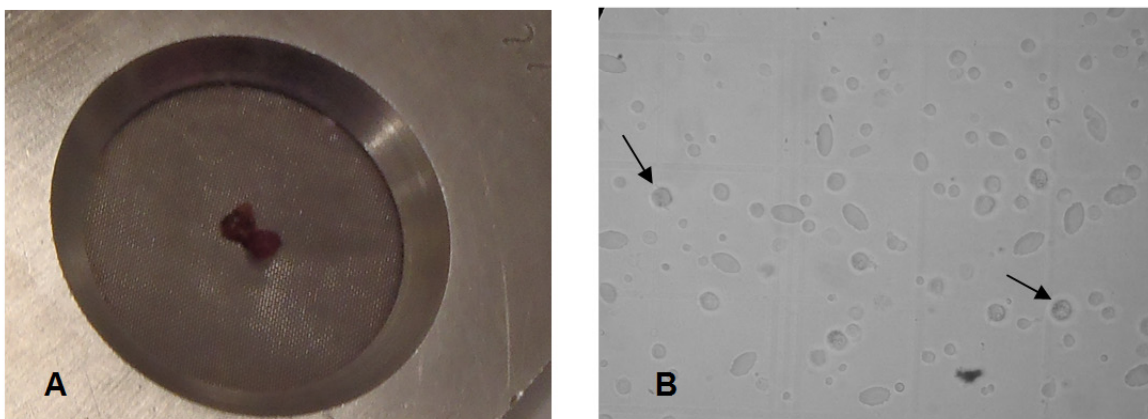


Figura 3. Fotografia em **A** mostrando o rim cefálico de *Astyanax* sp.1 em peneira com abertura de malha de 50µm. Fotomicrografia em **B** mostrando nas setas fagócitos de rim cefálico de *Astyanax* sp. 1

2.2. Segunda etapa: resistência ao transporte e armazenamento como isca-viva

2.2.1. Desenho experimental

Nesta etapa foram utilizados os mesmos peixes que compuseram o teste anterior. Após a biometria final, os peixes de C, T1 e T2 foram mantidos em jejum por 24 h e 80 peixes por tratamento (20 de cada repetição) foram capturados aleatoriamente e dispostos em três aquários de 50 L com aeração constante (um aquário para cada tratamento) até o momento da embalagem.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 X 2. Foram preparadas 24 embalagens de polietileno (tipo saco) de seis litros (35,0 x 25,0 cm), com dois litros de água de poço artesiano (temperatura: 19,4°C; oxigênio dissolvido: 9,15 mg L⁻¹; pH: 6,5; condutividade elétrica: 159,6 mS cm⁻¹; alcalinidade: 96 mg CaCO₃ L⁻¹; amônia <0,05 mg L⁻¹). Dos 80 peixes de C, T1 e T2, 40 foram embalados com 0,5 x 10⁹ UFC L⁻¹ de *B. subtilis* adicionados diretamente à água, e os outros 40 em embalagens sem o probiótico.

Cada embalagem foi considerada como uma repetição e recebeu 10 peixes, totalizando seis novos tratamentos com quatro repetições (Tabela 2)

Tabela 2. Concentrações de probiótico utilizadas nos tratamentos

Concentrações de <i>B. subtilis</i> utilizadas nas dietas e na água de transporte
Sem probiótico na ração e na água (Controle)
Sem probiótico na ração e 0,5x10 ⁹ UFC L ⁻¹ de água (TA)
5x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e sem probiótico na água (TB)
5x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e 0,5x10 ⁹ UFC L ⁻¹ de água (TC)
10x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e sem probiótico na água (TD)
10x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e 0,5x10 ⁹ UFC L ⁻¹ de água (TE)

Dentro de cada embalagem foi injetado oxigênio puro até a saturação e os sacos foram fechados com borracha elástica de modo que não houvesse vazamento (Figura 4). A densidade média de estocagem dos lambaris nas embalagens foi de 55,5 ± 5,4 g L⁻¹. No ato do fechamento dos sacos, o horário

foi anotado na etiqueta de identificação para que o tempo de sobrevivência fosse posteriormente mensurado.



Figura 4. Processo de embalagem de *Astyanax* sp. 1 para desafio de resistência ao transporte, com e sem probiótico na alimentação e na água

2.2.2. Análises

- Resistência ao transporte e tempo de sobrevivência nas embalagens

Após o fechamento, as embalagens foram acondicionadas em caixas de isopor, cobertas com lona e transportadas em carroceria de veículo automotivo utilitário por 80 km, sendo metade em estrada não pavimentada, simulando o trajeto do local de produção até a revenda de iscas-vivas (Figura 5).



Figura 5. Transporte de *Astyanax* sp. 1 com e sem probiótico na alimentação e na água

Após o transporte, as caixas foram dispostas em ambiente sombreado, simulando o período de comercialização. Foi realizada a verificação de mortalidade a cada 60 minutos. Os instantes letais de 10% (IL_{10} = 1peixe) e de 50% (IL_{50} = 5 peixes) em todas as repetições foram anotados para cálculo do tempo de sobrevivência (número de horas decorridas desde o momento da embalagem até o instante letal verificado). Os peixes foram considerados mortos quando já não apresentavam movimentação opercular. No instante da quinta morte, a embalagem foi aberta para as análises de água (Figura 6).

- Análise de água

No momento da abertura das embalagens (IL_{50}) o pH foi verificado com peagâmetro digital e uma amostra de 150 mL da água de cada repetição foi coletada, armazenada à 4° C por 24 h e submetida a análise de amônia total no laboratório de limnologia do Instituto de Pesca de São Paulo.



Figura 6. Acompanhamento dos instantes letais de *Astyanax* sp. 1, após o transporte com e sem probiótico na alimentação e na água

2.3. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por teste de Tukey, sendo as diferenças consideradas significativas quando $P < 0,05$. Foi utilizado o software SAS (Statistical Analysis System). Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Primeira etapa

Os parâmetros físicos e químicos médios da água mensurados durante a primeira fase do experimento foram: Temperatura: 26,6 °C; Oxigênio dissolvido: 5,98 mg L⁻¹; Transparência: 24,16 cm; pH: 6,2; Alcalinidade: 24,33 CaCO₃ mg L⁻¹; Condutividade Elétrica: 52,5 mS cm⁻¹.

As análises microbiológicas das dietas que receberam probiótico indicaram que houve recuperação nas mesmas concentrações adicionadas da bactéria *B. subtilis* (5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ e 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹) e que não houve contaminação na dieta controle.

O uso de *B. subtilis* como aditivo na alimentação do lambarí não interferiu significativamente nos índices zootécnicos dos peixes tratados quando comparados ao C (Tabela 3).

Tabela 3: Valores dos índices zootécnicos de *Astyanax* sp. 1 alimentados durante 59 dias com ração sem probiótico (C), com 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ (T1) e 10 x 10⁹ UFC (T2) de *Bacillus subtilis* na ração

Trat.	PT (g)	CT (cm)	GP (g)	CAA	TCE (%)	K	S (%)
C	11,31 ± 1,17	8,87 ± 0,26	11,01 ± 1,17	1,16 ± 0,14	6,14 ± 0,18	1,61 ± 0,11	84,06 ± 5,81
T1	10,88 ± 0,81	8,84 ± 0,22	10,58 ± 0,81	1,14 ± 0,07	6,08 ± 0,13	1,57 ± 0,03	85,93 ± 5,14
T2	11,09 ± 1,48	8,79 ± 0,34	10,79 ± 1,48	1,10 ± 0,08	6,10 ± 0,22	1,62 ± 0,08	87,18 ± 5,24

PT= peso total; CT=comprimento total; GP= ganho em peso; CAA=conversão alimentar aparente
K= fator de condição de Fulton (Le Cren, 1951); TCE=taxa de crescimento específico; S= sobrevivência

Os peixes de T2, que receberam 10 UFC kg⁻¹ de probiótico na ração acumularam significativamente mais proteína corporal se comparados com os peixes dos outros tratamentos. O teor de matéria seca também foi maior nos peixes deste tratamento (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de composição corporal de *Astyanax* sp. 1 alimentados durante 59 dias com ração sem probiótico (C), com 5×10^9 UFC kg^{-1} (T1) e 10×10^9 UFC (T2) de *Bacillus subtilis* na ração

Trat.	Matéria Seca (%)	Extrato Etéreo (%)	Proteína Bruta (%)	Cinzas (%)
C	$34,13 \pm 0,39^b$	$15,35 \pm 0,21$	$14,72 \pm 0,42^b$	$3,52 \pm 0,11$
T1	$33,63 \pm 0,34^b$	$15,30 \pm 0,41$	$14,44 \pm 0,22^b$	$3,27 \pm 0,12$
T2	$35,1 \pm 0,00^a$	$15,84 \pm 0,06$	$16,79 \pm 0,59^a$	$3,45 \pm 0,12$

^{ab} Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$

Não houve diferenças estatísticas no *burst* respiratório dos fagócitos extraídos dos peixes tratados com probiótico em relação ao verificado nos fagócitos dos peixes controle (Figura 7).

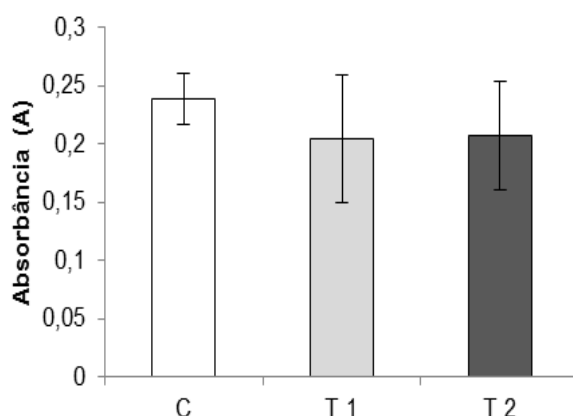


Figura 7. Valores de absorvância (A) lidos em espectrofotômetro (630 nm) da análise do *burst* respiratório de $10^7 \mu\text{L}^{-1}$ fagócitos extraídos dos rins cefálicos de *Astyanax* sp. 1 alimentados durante 59 dias com ração sem probiótico (C), com 5×10^9 UFC kg^{-1} (T1) e 10×10^9 UFC (T2) de *Bacillus subtilis* na ração

3.2. Segunda etapa

Os peixes de TB resistiram melhor às condições de armazenamento e transporte e demoraram significativamente mais para apresentarem a primeira morte (IL_{10}). O menor tempo de sobrevivência foi observado em TD, com IL_{10} inferior aos observados em TB e TE, porém não diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. Para o IL_{50} , TB se mostrou com valores mais altos que TE e TD, sendo este último menor que todos os outros tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5: Instantes letais médios e desvios-padrão da primeira (IL₁₀) e quinta mortes (IL₅₀) de *Astyanax* sp. 1 nos diferentes tratamentos

Concentrações de <i>B. subtilis</i> utilizadas nas dietas e na água de transporte	IL ₁₀ (h)	IL ₅₀ (h)
Sem probiótico na ração e na água (Controle)	37,94 ± 12,77 ^{bc}	108,55 ± 3,18 ^{ab}
Sem probiótico na ração e 0,5x10 ⁹ UFC L ⁻¹ de água (TA)	34,42 ± 15,20 ^{bc}	101,21 ± 23,80 ^{ab}
5x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e sem probiótico na água (TB)	84,36 ± 13,68 ^a	118,66 ± 10,16 ^a
5x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e 0,5x10 ⁹ UFC L ⁻¹ de água (TC)	27,28 ± 14,47 ^{bc}	107,56 ± 0,34 ^{ab}
10x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e sem probiótico na água (TD)	16,21 ± 1,77 ^c	57,8 ± 4,43 ^c
10x10 ⁹ UFC kg ⁻¹ de ração e 0,5x10 ⁹ UFC L ⁻¹ de água (TE)	57,16 ± 29,29 ^b	88,68 ± 23,12 ^b

^{abc} Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey p<0,05

A concentração de amônia total na água de transporte foi significativamente mais elevada em TD quando comparada com TA e TB (Figura 8). O pH mais básico foi encontrado em TE, enquanto que a água com maior acidez foi a de TD. (Figura 9)

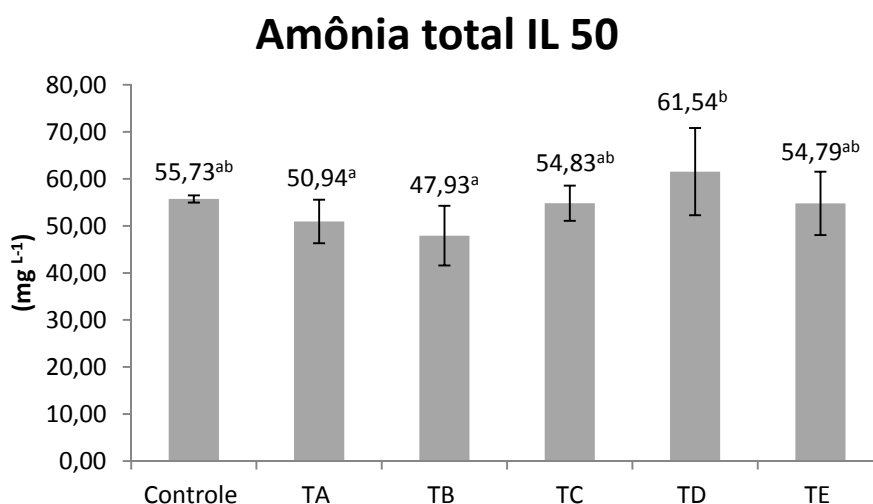


Figura 8: Valores médios e desvios padrão dos valores de amônia total da água de transporte de *Astyanax* sp. 1 no IL₅₀, armazenados em sacos de polietileno, sem *Bacillus subtilis* na água de transporte e na ração (**Controle**); com 0,5 UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte e sem probiótico na ração (**TA**); sem probiótico na água de transporte, com 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TB**); com 0,5 UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte, com 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TC**); sem probiótico na água de transporte, com 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TD**); com 0,5 UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte e 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TE**)

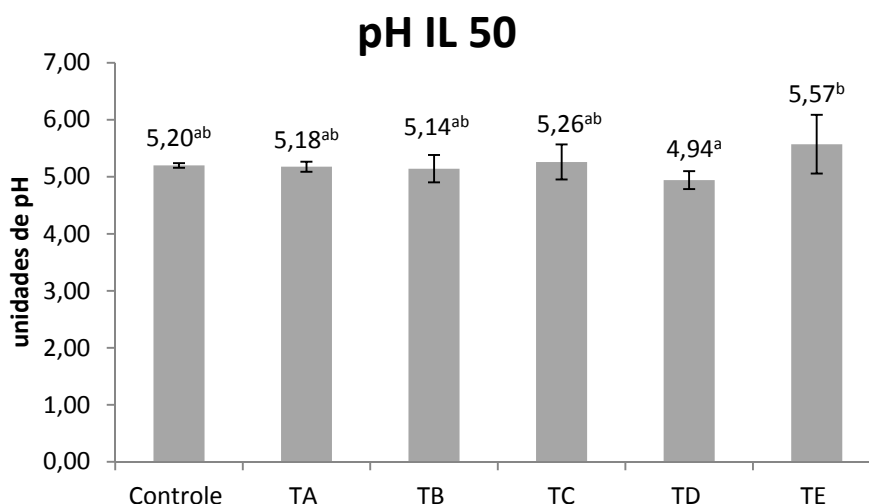


Figura 9: Valores médios e desvios padrão dos valores de pH da água de transporte de *Astyanax* sp. 1 no IL₅₀, armazenados em sacos de polietileno, sem *Bacillus subtilis* na água de transporte e na ração (**Controle**); com 0,5 UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte e sem probiótico na ração (**TA**); sem probiótico na água de transporte, com 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TB**); com 0,5 UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte, com 5 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TC**); sem probiótico na água de transporte, com 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TD**); com 0,5 UFC L⁻¹ de probiótico na água de transporte e 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de probiótico na ração (**TE**)

4. DISCUSSÃO

4.1. Primeira etapa

Os parâmetros de qualidade de água medidos durante todo o período experimental estão dentro dos recomendados por Garutti (2003) para a criação do lambari-do-rabo-amarelo (*A. altiparanae*) e não interferiram nos resultados zootécnicos. Os tanques-rede experimentais foram instalados dentro de um mesmo viveiro, desta forma as variações químicas e físicas da água foram comuns a todas as repetições.

A confirmação da bactéria nas análises microbiológicas das rações contendo probiótico indica que os bacilos permaneceram viáveis após o período de armazenamento de 30 dias e que as temperaturas entre 3 e 7°C se mostraram eficientes para a conservação de ração adicionada de *B. subtilis*. Aly *et al.* (2008) encontraram maior quantidade de células viáveis nas dietas

contendo *B. subtilis* armazenadas a 4°C quando comparadas às armazenadas a 25°C, no período de até quatro semanas, confirmando o observado no presente estudo.

A ausência de diferenças significativas entre as médias dos parâmetros zootécnicos dos diferentes tratamentos indica que o *B. subtilis* ofertado continuamente como aditivo alimentar nas concentrações de 5×10^9 e 10×10^9 UFC kg^{-1} de ração não atuou como promotor de crescimento para *Astyanax* sp. 1. Souza *et al.* (2010) e Barbosa *et al.* (2011), testando a influência de *L. plantarum* em robalo-peva (*C. paralellus*), também não verificaram diferenças nos índices zootécnicos. Já Carnevali *et al.* (2006), testando a influência de probiótico em *Dicentrarchus labrax*, utilizando *L. delbrueckii delbrueckii* isolados do próprio *D. labrax*, registraram ganho em peso 81% maior nos peixes alimentados com o probiótico quando comparados ao grupo controle. O probiótico utilizado não foi desenvolvido especificamente para a espécie, ao contrário do testado por Carnevali *et al.* (2006), e não atuou como promotor de crescimento dos peixes como observado em outros trabalhos científicos.

Os valores médios de sobrevivência encontrados estão muito próximos aos verificados por Sussel (2012) para *A. altiparanae* criados em tanques-rede. Não houve diferenças significativas entre as taxas de sobrevivência dos diferentes tratamentos, contrastando o relatado por Aly *et al.* (2008) que registraram maior sobrevivência em *Oreochromis niloticus* tratados com *B. subtilis* quando comparados aos peixes do controle.

As taxas de conversão alimentar (CAA) próximas de 1, observadas em todos os tratamentos, demonstram que a eficiência alimentar foi alta e que o aproveitamento da ração foi elevado. Sussel (2012), em experimento com *A. altiparanae*, observou taxas de conversão alimentar médias de 1,64, utilizando rações com 26% de proteína bruta (PB). A concentração de PB de 40% utilizada nas dietas do presente estudo pode ter estimulado o crescimento dos peixes e melhorado a conversão alimentar, justificando as diferenças entre os dois trabalhos. Vilela e Hayashi (2001) encontraram para *A. bimaculatus* (*A. altiparanae*) valores de conversão semelhantes aos verificados neste estudo, contudo utilizaram alimentação com 45% de PB e densidades mais baixas. É possível que *Astyanax* sp. 1 seja mais eficiente na conversão dos alimentos

do que *A. altiparanae*, sendo necessários estudos comparativos entre as duas espécies.

Aos 59 dias, os peixes do presente estudo apresentaram médias de comprimento de 88 mm. Garutti (2003) encontrou para *A. altiparanae* criados durante 56 dias, na densidade de 233 peixes m⁻², em viveiros escavados, peixes com média de comprimento de 60 mm. Sussel (2012) utilizou densidade de 450 peixes m⁻³ em tanques-rede e obtiveram, aos 63 dias, *A. altiparanae* com 70,9 mm. Costa (2012) testou em tanques-rede densidades de 300, 450 e 600 peixes m⁻³ e verificou que a menor densidade foi a que proporcionou maior crescimento e ganho em peso. A baixa densidade de estocagem utilizada no presente estudo (80 peixes m⁻³) pode ter ocasionado maior crescimento quando comparado aos trabalhos descritos anteriormente.

O maior acúmulo de proteína corporal e a menor umidade verificados nos peixes de T2 indicam que os peixes deste tratamento foram mais eficientes no aproveitamento dos ingredientes protéicos disponibilizados na ração ofertada, assim como observou Miranda (2012) em *A. altiparanae* alimentados com levedura de cerveja. A maior atividade microbiana nos peixes deste tratamento, em função da maior concentração de probiótico ofertada, proporciona melhor aproveitamento de vitaminas e aminoácidos essenciais da dieta (DALL and MORIARTY, 1983), aumentando a síntese de proteínas nos peixes de T2 e seu acúmulo na carcaça. Entretanto, não houve influência deste resultado no ganho em peso dos animais tratados.

Maiores teores proteicos são favoráveis quando se preconiza o destino do pescado à alimentação humana ou de peixes carnívoros. No norte do país, algumas espécies de lambaris são utilizadas para a extração de óleo (GARUTTI, 2003), neste caso, peixes com maiores teores de gordura seriam desejáveis. Mello (2012) encontrou maiores valores de proteína total e menores teores lipídicos em *O. niloticus* tratados com *B. subtilis* e *B. cereus* quando comparados aos peixes controle. Entretanto, alguns estudos que relacionam a composição corporal com a inclusão de probióticos na dieta dos animais não encontram correlações positivas (BARBOSA *et al.*, 2011).

O resultado do teste do *burst* respiratório indicou que a oferta contínua de 5 x 10⁹ e 10 x 10⁹ UFC kg⁻¹ de *B. subtilis* na ração não estimulou a atividade oxidativa dos fagócitos extraídos dos rins cefálicos dos peixes. Segundo

Merrifield *et al.* (2010), o uso contínuo de imunostimulantes em peixes causa diminuição na atividade imunológica e, em alguns casos, imunossupressão. No presente estudo, pôde-se verificar que, mesmo não havendo diferenças significativas, os peixes tratados com probiótico apresentaram um decréscimo na atividade oxidativa durante a fagocitose quando comparados aos peixes controle. Os desvios mais altos observados nos peixes que receberam *B. subtilis* indicam que houve maior variação na capacidade dos fagócitos de realizarem a oxidação, enquanto que os fagócitos extraídos dos peixes controle demonstraram maior homogeneidade na oxidação das partículas fagocitadas. Em situação de criação, lotes de peixes homogêneos são preconizados.

Assim como o observado no presente estudo, Dias-Rosález *et al.* (2006) e Cerezuela *et al.* (2012) não encontraram diferenças estatísticas entre os valores do *burst* respiratório dos fagócitos de *Sparus aurata* tratados com probióticos e os peixes do controle. Entretanto, Geng *et al.* (2011) verificaram incremento no *burst* respiratório do bijupirá (*Rachycentron canadum*), alimentado com uma combinação de quitosana e *B. subtilis* incluídos na ração, quando comparado com os peixes do controle. Cook *et al.* (2003) também relatam incremento na atividade respiratória dos fagócitos dos rins cefálicos de *Pargus aurata* alimentados com β -glucano quando comparadas com o controle. Merrifield *et al.* (2010) sugerem que as aplicações de probióticos em curto período ou em regime alternado de fornecimento podem ser mais eficientes como imunostimulantes do que quando ofertados continuamente, contudo mais pesquisas são necessárias para a confirmação do melhor regime de fornecimento para as diferentes espécies e condições de criação.

4.2. Segunda etapa

As pesquisas em transporte de peixes vivos têm preconizado a redução do estresse pelo controle das taxas metabólicas e degradação dos resíduos nitrogenados durante o transporte, mas raramente focam seus esforços em melhorar a resistência dos peixes antes do processo de embalagem (LIM *et al.*, 2003). O uso de probióticos em peixes já demonstrou diminuir o estresse durante a criação (ROLLO *et al.*, 2006; TAOKA *et al.*, 2006), aumentar a sobrevivência e melhorar as condições da água durante o transporte (RAJ *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009).

No presente estudo, no decorrer do desafio, foi evidente a hiperexcitabilidade e a perda de equilíbrio dos animais antes de cessarem os batimentos operculares, citados por Twitchen and Eddy (1994) como os principais sintomas de intoxicação aguda por amônia em peixes. Os altos índices de amônia total na água podem ter sido a principal causa das mortes e estão relacionados não somente aos resíduos metabólicos dos peixes, mas também à decomposição dos animais mortos. Martinez *et al.* (2006) encontraram toxicidade aguda de amônia total para *A. altiparanae* com CL_{50} de $5,51 \text{ mg L}^{-1}$, sendo que os valores de amônia total média foram dez vezes maiores no momento do IL_{50} de *Astyanax* sp. 1 no presente estudo, demonstrando a elevada tolerância da espécie.

A adição de $5 \times 10^9 \text{ UFC kg}^{-1}$ de *B. subtilis* na ração e a não inclusão de probiótico na água de transporte em TB foi a combinação que demonstrou o maior tempo de sobrevivência (IL_{10}) observado entre todos os tratamentos e foi diretamente proporcional ao menor acúmulo de amônia verificado na água das embalagens. É possível que esta concentração de probiótico na ração, fornecida anteriormente ao desafio, tenha melhorado a digestibilidade dos alimentos antes do jejum, diminuindo a produção de metabólitos e seu acúmulo na água de transporte, reduzindo o estresse e aumentando a sobrevivência dos peixes.

Os níveis mais altos de amônia total e a maior acidez na água foram encontrados em TD e são proporcionais ao menor tempo de sobrevivência verificado nos peixes deste tratamento. Merrifield *et al.* (2010) ressaltam que a concentração de probiótico fornecida é um fator importante a ser considerado e que mais ensaios do tipo dose-resposta devem ser realizados para se compreender os efeitos adversos de probióticos quando mal administrados. A adição de $10 \times 10^9 \text{ UFC kg}^{-1}$ nas dietas combinada com a não inclusão do probiótico na água de transporte pode ter aumentado os processos metabólicos e a respiração celular, elevando a concentração de amônia na água e de CO_2 na atmosfera das embalagens, conseqüentemente diminuindo o pH da água. De acordo com Lim *et al.* (2003), o fator limitante para um sistema de transporte de peixes vivos é a deterioração da qualidade da água de transporte devido ao acúmulo de resíduos metabólicos.

A inclusão de *B. subtilis* na água de transporte proporcionou aumento do IL_{10} em 30 horas e do IL_{50} em 43 horas nos peixes que receberam 10×10^9 UFC kg^{-1} na ração (TE). Raj *et al.* (2008), utilizando na água de transporte o probiótico comercial composto de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. acidophilus* e *Saccharomyces cerevisia*, observaram aumento na sobrevivência de *Catla catla* tratados antes e durante o transporte, quando comparados ao controle. Entretanto, a inclusão do probiótico na água das embalagens dos peixes que receberam 5×10^9 UFC kg^{-1} na ração diminuiu o IL_{10} em 57 horas e o IL_{50} em 11 horas. É possível que a concentração de 5×10^9 UFC kg^{-1} na ração tenha sido a ideal e que a inclusão do probiótico na água tenha causado distúrbios nos peixes, diminuindo o tempo de sobrevivência.

As embalagens de polietileno demonstraram no presente estudo ser uma boa alternativa para o transporte de iscas-vivas. O tempo de primeira morte de 84,33 h observado em TB indica que, em situações práticas, o produtor poderia entregar as embalagens com as iscas-vivas para as revendas na véspera do final-de-semana e os lambaris continuariam vivos por ao menos três dias, se adotada a mesma metodologia de produção reproduzida neste estudo.

5. CONCLUSÃO

A adição de *Bacillus subtilis* na ração fornecida ao lambari *Astyanax* sp.1, nas concentrações utilizadas, não altera o desempenho zootécnico e a atividade oxidativa dos fagócitos (*burst* respiratório) dos peixes. Quando ofertado na concentração de 10×10^9 UFC kg^{-1} proporciona maior acúmulo de proteína corporal.

O fornecimento de 5×10^9 UFC kg^{-1} de *B. subtilis* como aditivo alimentar aumentou o tempo de sobrevivência dos peixes nas embalagens e diminuiu a concentração de amônia total na água. A inclusão de $0,5 \times 10^9$ UFC L^{-1} de probiótico na água de transporte não demonstrou resultados positivos.

Para o transporte e comercialização desta espécie em sacos de polietileno, recomenda-se ofertar como aditivo alimentar 5×10^9 UFC kg^{-1} de *B. subtilis* na ração dos peixes durante todo o ciclo produtivo.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais a Benedito Aguiar, André Aguiar e Edilberto Rufino, técnicos da estação de piscicultura da APTA de Pariquera-Açú, a Guilherme Silveira Telli, do Instituto de Pesca de São Paulo, pelas análises estatísticas, a André Koga do LIAH da UNASP pela ajuda com as análises do *burst* respiratório e a Oswaldo Oyakawa do Museu de Zoologia da USP, pela identificação dos animais.

7. REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, C.A.; MOLINARI, S.L.; AGOSTINHO, A.A.; VERANI, J.R. 1984 Ciclo reprodutivo e primeira maturação de fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) (Osteichthyes - Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. *Revista Brasileira de Biologia*,44(1): 31-36.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. 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): 128-136.

AOAC-Association of Official Analytical Chemists. 1984 *Official methods of analysis*. 12^a ed. Washington. 1015p.

BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; CORREA, B.S.; MOURINO, J.L.P.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R., 2011 Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) Fed Probiotic in Laboratory Conditions. *Brazilian archives of biology and technology*, 54(4): 795-801.

BOYD, C.E. and MASSAUT, L. 1999 Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engeneering*, 20: 113-132.

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

CARVALHO, E.S.; GOMES, L.C.; BRANDÃO, F.R.; CRESCÊNCIO, R. 2008 Uso do probiótico Efinol[®]L durante o transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(6):1322-1327.

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F.A.; GONZÁLES, P.; MESEQUER, J.; ESTEBÁN, M.A. 2012 Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune

response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(2): 342-349.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. 2003 Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco Ativa™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae*) in winter. *Fish and Shellfish Immunology*, 14(4): 333-345.

COSTA, B.B. 2012 *Densidade de estocagem de lambari (Astyanax altiparanae) em tanques-rede*. São Carlos. 48 p. (Dissertação de Mestrado Universidade Federal de São Carlos). Disponível em: <http://www.bdtd.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_arquivos/20/TDE-2012-10-08T173240Z-4689/Publico/4573.pdf> Acesso em: 17 jan. 2013.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. 2004 *Anesthetic in aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication, 3900. Texas. 6p.

DALL, W. and MORIARTY, D.J.W. 1983 Functional aspects of nutrition and digestion. In: MANTEL, L.H., *The Biology of Crustacea*, vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. New York: Academic Press. 122p.

DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C.F.; BORDON, I.C.A.C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2012 Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1): 40-45.

DIAZ-ROSALES, P.; SALINAS, I.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, A.; CHABRILLON, M.; BALEBONA, M.C. 2006 Gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(4): 482-492.

GARUTTI, V. 2003 *Piscicultura ecológica*. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP. 69p.

GENG, X.; DONG, X-H.; TAN, B-P.; YANG, Q-H.; CHI, S-Y.; LIU, H-Y.; LIU, X-Q. 2011 Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunology*, 31: 400-406.

GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. 1978 *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. 2ª ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 213p.

KENNEDY, S.B.; TUCKER JR., J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER, V.R.; JARRELL, J.L.; SENNETT, D.G. 1998 Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 62(2): 573-588.

LE CREN, E.D. 1951 The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20(2): 201-219.

LIM, L.C.; DHERT, P; SORGELOOS, P. 2003 Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research*, 34(11): 923-935.

MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. 2006 Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. *Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.81-95.

MELLO, H. 2012 *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na suplementação dietária de juvenis de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito probiótico. Jaboticabal. 44p.(Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura). Disponível em: < ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca /Instrucoes _aos_autores_2012.pdf> Acesso em: 22 jun. 2013.

MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. 2010 The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2): 1-18.

MIRANDA, L.T.V. 2012 Levedura *Sacharomices cerevisiae* como probiótico em dietas para lambari-do-rabo-amarelo. 49p. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Disponível em <http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=469> Acesso em: 13 abr. 2013.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; PRUSTY, A.K.; DAS, P.; PANIPRASAD, K.; MOHANTA, K.N. 2012 Use of different microbial probiotics in the diet of rohu *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18(1): 1-11.

OYAKAWA, O.T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. 2006 *Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do vale do rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo*. São Paulo: Editora Neotropica. 201p.

RAJ, A.J.A.; SURESH, A.V.; MARIMUTHU, K.; APPELBAUM, S. 2008 Probiotic performance on fish fry during packing, transportation stress and post-transportation condition. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3(2): 152-157.

ROLLO, A.; SULPIZIO, R.; NARDI, M.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CAGGIANO, M; CRESCI, A; CARNEVALI, O. 2006 Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(2): 167-177.

SUSSEL, F.R. 2012 *Fontes e níveis de proteína na alimentação do lambari-do-rabo-amarelo: desempenho produtivo e análise econômica*. Pirassununga. 105p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/174/174131/tde-18032013-133242/pt-br.php>> Acesso em: 12 jun. 2013.

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

TWITCHEN, I.D. and EDDY, F.B. 1994 Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. In: MÜLLER, R. and LLOYD, R. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Fishing News Books. p.135-147.

WANG, Y. 2007 Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1-4): 259-264.

VILELA, C. e HAYASHI, C. 2001 Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Acta Scientiarum*, 23(2):491-496.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Robalo-Flecha

A criação de robalos no Brasil ainda está distante de alcançar a viabilidade econômica, muito em função dos problemas de crescimento e reprodução das espécies, mas também por falta de pesquisas com a produção em campo.

Com este trabalho foi possível gerar conhecimento sobre as condições de uma unidade produtiva em ambiente estuarino, onde os fatores capazes de influenciar a produtividade do empreendimento são determinantes para o sucesso da atividade. Em laboratório, quando se controlam todas as variáveis ambientais para que o peixe responda ao que está sendo testado, pode-se superestimar ou subestimar o desempenho produtivo da espécie. Em campo, onde as variações de maré, salinidade, temperatura, transparência e luminosidade são intensas, onde há constante pressão de predadores externos, possibilidade de acidentes com embarcações ou objetos flutuantes, onde a incrustação é um dos principais problemas de produção, demandando trocas mensais de panagens, o desempenho dos peixes não é o mesmo do que o citado na literatura para condições laboratoriais. Todos estes fatores, entre diversos outros, acabam por retardar o crescimento dos peixes.

Entretanto, deve-se considerar que o ambiente estuarino apresenta algumas vantagens em relação aos laboratórios. A constante presença de organismos que podem complementar a alimentação dos robalos é benéfica. Durante algumas operações de manejo, foi possível verificar nos peixes maiores a ingestão de caranguejos e siris.

A independência de fontes energéticas para a oxigenação e renovação de água também é um fator vantajoso. Não são raros os relatos de experimentos que deram errado devido à mortalidade após queda no fornecimento de energia. Contudo, a permanência de alevinos muito pequenos diretamente no ambiente estuarino, sem controle de temperatura e velocidade de marés, certamente colabora para o baixo desempenho da espécie. É mais seguro manter os peixes em sistema controlado até atingirem 30 g de peso e, aí sim, transferi-los aos tanques-rede.

O canibalismo acentuado, verificado durante todo o período experimental, foi a principal causa de mortalidade no experimento. Triagens constantes se fazem necessárias para separação dos peixes por classes de tamanho, para que os maiores não se alimentem dos menores. No experimento, esta prática não foi possível em função dos diferentes tratamentos e da indisponibilidade de espaço e tanques-rede. Peixes com a mesma classe de tamanho não demonstraram este comportamento canibal.

Durante o período de aclimação, foram oferecidas aos peixes duas rações com peletes de 1,0 mm e 45% de proteína bruta, sendo uma extrusada e a outra peletizada. Os peixes não demonstraram atividade alimentar na superfície, dando preferência pela ração peletizada, sendo esta a escolhida para compor os desafios alimentares.

A conversão alimentar elevada encontrada neste estudo não representa realmente o potencial desta espécie e da dieta ofertada. Muitos peletes foram perdidos pela sua característica de rápido afundamento, sendo que, em laboratório, esses peletes seriam retirados e descontados do cálculo de fornecimento de ração. A transparência da água influenciou nesta situação, onde não era possível saber, algumas vezes, se os peixes tinham efetivamente ingerido a ração. A força das marés, em alguns casos, também dificultou a permanência dos peletes dentro do tanque-rede.

A oferta de probiótico aos peixes de forma contínua parece ser uma alternativa interessante, uma vez que, mesmo sem diferenças estatísticas, promoveu maior ganho em peso e melhores taxas de conversão alimentar nos animais. As próximas pesquisas envolvendo probióticos e robalos-flecha devem se concentrar em isolar bactérias do próprio trato intestinal dos peixes criados em ambiente estuarino, para verificar se a especificidade hospedeiro/probiótico influencia na eficiência da bactéria como promotora de benefícios para a espécie. Testes do tipo dose-resposta devem ser conduzidos para verificação da melhor concentração bacteriana para os peixes. Pesquisas voltadas para a atividade produtiva também devem ser conduzidas, principalmente em manejo dos peixes, materiais para tanques-rede e combate a incrustação, foto-exposição, alimento vivo, rejeito de pesca, entre outras.

Lambari (*Astyanax* sp. 1)

Os lambaris são peixes bastante conhecidos pelos pescadores amadores na região do Vale do Ribeira, que o procuram por sua esportividade, pelo sabor de sua carne e pela possibilidade de utilizá-lo como isca-viva. Entretanto, este foi o primeiro relato de criação e manejo desta espécie em cativeiro. Apesar de ser uma espécie nativa, abundante na região e de fácil manejo reprodutivo, ainda não houve interesse por parte dos criadores em utilizá-la como alternativa de renda.

Esta espécie demonstrou em cativeiro ter um ótimo potencial produtivo, chegando à idade de comercialização como isca-viva aos 75 dias, em média. Se o produtor adquirir os alevinos com 3,0 cm o tempo de engorda até atingir 8,0 cm vai de 45 a 60 dias. Pode-se então programar quatro despescas por ano em um único viveiro.

Outro aspecto interessante é que este lambari, como a maioria das espécies deste gênero, desova sem indução hormonal, podendo-se formar plantéis de reprodutores dentro da própria propriedade, efetuando a desova naturalmente dentro dos viveiros. Durante todo o ano foram observadas desovas nos viveiros da APTA-Pólo Regional Vale do Ribeira.

O comércio de iscas vivas na região é uma atividade desordenada, sem padrão e geralmente beirando à informalidade. O intuito de realizar o trabalho de resistência da espécie ao transporte e à comercialização em embalagens de polietileno foi de tentar criar uma tendência na atividade comercial de iscas-vivas. Produzir uma espécie nativa, ao invés de coletá-la no ambiente traz inúmeras vantagens não só ambientais, mas também sociais. Uma cadeia de atividades é gerada, criando trabalho e movendo a economia local.

Normalmente o comércio de iscas-vivas depende dos coletores extrativistas (e da disponibilidade ambiental para que as iscas sejam capturadas) e de uma revenda, que normalmente se traduz em marinas ou atravessadores. As iscas ficam expostas em caixas, baldes, aquários ou tanques. O comprador leva um recipiente para transportá-las e o vendedor captura, aleatoriamente, a quantidade que lhe foi pedida. O comércio em embalagens de polietileno pode diminuir o estresse no momento do transporte e da seleção, pois o peixe viaja sempre dentro do mesmo recipiente e o vendedor não precisa manuseá-lo no momento da seleção. O tamanho dos

peixes pode ser padronizado dentro das embalagens, evitando o contato manual desnecessário com os animais. O tempo de até 3 dias para ocorrer a primeira morte, verificado neste estudo, demonstra que este método é bastante interessante, tanto para o comerciante quanto para o consumidor, que poderia transportar as iscas por longos períodos.

O *Bacillus subtilis* ofertado continuamente na alimentação, se mostrou eficiente para aumentar a resistência dos animais a este período dentro das embalagens, mas não foi muito interessante na água de transporte. Sugere-se que pesquisas nesta área devam ser efetuadas, assim como com regimes alternados de fornecimento, com outras espécies bacterianas e outras concentrações na alimentação e na água.