

Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual

Probiotics in diets for Nile tilapia during the sex reversal

Daniele Menezes Albuquerque^{I,V} Nilton Garcia Marengoni^{II,V} Wilson Rogério Boscolo^{III}
Ricardo Pereira Ribeiro^{IV} Ison Mahl^V Milton César de Moura^V

RESUMO

Objetivou-se avaliar o desempenho produtivo, sexagem fenotípica e microbiologia intestinal de tilápia do Nilo, linhagem GIFT, alimentadas com ração contendo *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102, durante a fase de reversão sexual. Os peixes (24,7±0,50mg) foram distribuídos aleatoriamente em 24 aquários, num delineamento inteiramente casualizado, composto por três tratamentos (dois probióticos e ausente de probiótico) e oito repetições. A utilização de *B. cereus* melhorou os parâmetros de peso final, ganho em peso, ganho em peso médio diário e crescimento específico dos peixes alimentados em relação à *B. subtilis*. Não houve associação entre a proporção de machos e fêmeas e a inclusão de probióticos. As contagens de bactérias totais e coliformes totais não foram influenciadas pela adição de probióticos nas rações. O probiótico *Bacillus subtilis* não melhora o desempenho produtivo das tilápias do Nilo. Na decisão entre os dois probióticos estudados, recomenda-se o probiótico contendo *Bacillus cereus* C-3102 por não afetar negativamente a efetividade sexual e parâmetros zootécnicos.

Palavras-chave: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, *Bacillus subtilis* C-3102, desempenho produtivo, microbiologia, sexo fenotípico, tilapicultura.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the productive performance, phenotypic sexing, and intestinal microbiology of Nile tilapia, GIFT strain, fed with diets formulated with *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102, during sex reversal. Fish (24.7±0.50mg) were randomly distributed in 24 aquaria in a completely randomized design compound for three treatments (two probiotics and absent) and eight replications. The use of *B. cereus* and improved the final weight, weight gain, average daily weight

gain and specific growth rate fed in relation to *B. subtilis*. There was no association between the proportion of males and females and inclusion of the probiotics. The counts of total bacteria and total coliforms were not influenced by the addition of probiotics. *Bacillus subtilis* did not improve the productive performance in Nile tilapia. *Bacillus subtilis* did not improve the productive performance of Nile tilapia. Among the two studied probiotics is recommended probiotic containing *Bacillus cereus* C-3102 not adversely affect the sex reversal effectiveness and performance zootechnical.

Key words: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, *Bacillus subtilis* C-3102, microbiology, phenotypic sexing, productive performance, tilapia culture.

INTRODUÇÃO

A tilapicultura é uma importante atividade agropecuária que gera emprego e renda e tem sido considerada uma forte cadeia aquícola na produção de alimentos no Brasil.

O surgimento de doenças ocasionadas pelo estresse durante o cultivo de alevinos pode ser comum, ocorrendo grandes mortalidades e prejuízos econômicos ao produtor. A minimização desses problemas tem fomentado várias pesquisas nos últimos anos, visando a substituir os antibióticos por probióticos na produção animal, especialmente em cultivos de organismos aquáticos (NAYAK, 2010).

^IPrograma de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil. E-mail: daniellemenezes2003@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

^{III}Centro de Engenharias e Ciências Exatas, UNIOESTE, Toledo, PR, Brasil.

^{IV}UEM, Maringá, PR, Brasil.

^VGrupo de Estudos em Tilapicultura, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

A FAO/WHO (2002) define probióticos como microorganismos vivos que, administrados adequadamente, geram benefícios ao animal hospedeiro. Como produto promotor de crescimento, deve possuir algumas características, tais como, conseguir sobreviver ao trato gastrointestinal, aderir células da parede intestinal, reduzir ou prevenir patógenos, não ser patogênico ao hospedeiro, além de sobreviver a longos períodos de estocagem e armazenagem (SAAD, 2006). Segundo NAYAK (2010) e CHANTHARASOPHON et al. (2011), são utilizadas diversas bactérias probióticas para piscicultura, exemplificando o gênero *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*) e até mesmo algumas espécies do gênero *Aeromonas* e outros grupos de bifidobactérias.

Os *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* são ótimos candidatos a probióticos utilizados em organismos aquáticos. Segundo EL-HAROUN et al. (2006), as espécies dessas bactérias podem ser liofilizadas e, portanto, são capazes de sobreviver a altas temperaturas, como, por exemplo, após o processo de peletização, podem ser armazenadas em temperatura ambiente sem qualquer efeito deletério, resistindo ao baixo pH e podendo chegar intactos ao intestino delgado (CUTTING, 2011).

Além disso, essas bactérias gram positivas podem atuar na melhoria da qualidade de água, oxidando matéria orgânica e CO₂ particulado. Diversas pesquisas relatam que esse gênero pode aumentar o ganho em peso, além de diminuir a incidência de patógenos em organismos aquáticos (FARZANFAR, 2006; KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Tendo em vista a necessidade de minimizar o lançamento de efluentes oriundos dos cultivos de peixes, os probióticos são alternativas para a solução desse problema, pois alguns trabalhos envolvendo organismos aquáticos (EL-HAROUN et al., 2006; MARENGONI et al., 2010) argumentam que estes microorganismos podem melhorar a conversão alimentar, resultando assim em menor quantidade de resíduos no meio ambiente e um menor custo ao produtor. Poucos são os trabalhos científicos que elucidam a utilização de probiótico em rações formuladas para peixes, portanto é necessário fomentar as pesquisas neste setor de estudo, que é um dos elos considerados básicos na tilapicultura.

Dessa forma, este estudo teve como objetivos avaliar o desempenho produtivo, sexo fenotípico e microbiologia intestinal de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem GIFT, alimentadas com rações formuladas sob

inclusão dos probióticos *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 no período de reversão sexual.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 1200 pós-larvas com peso médio inicial de 24,7±0,50mg adquiridas em uma piscicultura comercial. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 aquários de 30L, num delineamento inteiramente casualizado composto por três tratamentos e oito repetições, constituído por dois probióticos e um tratamento isento de probiótico. Considerou-se uma unidade experimental um aquário com volume útil de 30L contendo 50 pós-larvas.

Utilizaram-se dois produtos comerciais como promotores de crescimento, um probiótico contendo espécies da bactéria *Bacillus subtilis* C-3102 e o outro *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Tabela 1). As rações foram confeccionadas utilizando a metodologia adaptada de PEZZATO et al. (2002). Nas rações que continham na fórmula probiótico, acrescentou-se 1% do produto no momento da mistura dos ingredientes (ALBUQUERQUE, 2011).

Durante um período de 30 dias, os animais foram revertidos sexualmente, adicionando nas rações experimentais o andrógeno sintético 17- α -metiltestosterona, por volatilização de álcool etílico numa concentração de 60mg kg⁻¹. Os peixes foram alimentados *ad libitum* seis vezes ao dia e, ao final do dia, todos os aquários foram sifonados para retirar possíveis resíduos de fezes e ração.

Ao final da fase de reversão sexual, foram analisados os dados de peso final, ganho em peso, conversão alimentar aparente e sobrevivência. A taxa de crescimento específico (TCE) e o fator de condição de Fulton, chamado isométrico (Kn), foram calculados conforme adaptações de WEATHERLEY (1972) e VAZOLLER (1996) para calcular o grau de hígidez dos indivíduos e com isso refletir as condições alimentares recentes.

Semanalmente, foram monitoradas as variáveis dos parâmetros físicos e químicos da água como oxigênio dissolvido e temperatura, utilizando oxímetro digital com auxílio de potenciômetros dos modelos YSI 550A-DO (YSI Environmental, Yellow Springs, EUA), pH HI 8314 e condutividade HI 9033 da marca Hanna Instruments®, respectivamente.

Ao final do período de reversão sexual, foram retirados aleatoriamente dez peixes de cada unidade experimental e, sequencialmente, realizados os exames de análises de machos e fêmeas, utilizando o método adaptado de retirada, esfregaço e microscopia

Tabela 1 - Composição percentual e química das rações experimentais para alevinos de tilápia do Nilo, cultivados durante a fase de reversão sexual.

Ingrediente	Bactéria		
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Farelo de soja	44,91	44,25	44,25
Farinha de peixe	24,50	24,65	24,65
Farelo de milho	24,13	23,07	23,07
Probiótico	-	1,00	1,00
Premix MV ⁽¹⁾	1,00	1,00	1,00
DL-metionina	0,21	0,21	0,21
Antioxidante	0,02	0,02	0,02
Óleo de soja	3,71	4,28	4,28
Fosfato bicálcico	2,12	2,13	2,13
Calcário calcítico	-	0,01	0,01
Sal	0,30	0,30	0,30
Total	100	100	100
Nutriente	----- (%) -----		
Amido	15,04	16,29	16,29
Cálcio	1,55	1,44	1,44
Energia digestível (tilápia)	3296,00	3272,00	3272,00
Fibra bruta	3,22	2,96	2,96
Fósforo total	1,11	1,00	1,00
Gordura	6,565	5,92	5,92
Lisina total	2,35	2,39	2,39
Metionina total	0,87	1,05	1,05
Proteína bruta	37,53	37,24	37,24

⁽¹⁾Premix mineral vitamínico: Composição por kg de produto: ferro=10,312mg; manganês=6,875mg; cobre=1,100mg; zinco=16,500mg; iodo=137mg; cobalto=82,50mg; selênio=124,00mg; cromo=68,75mg; vit.A=1.100.000UI; vit.D3=344.000UI; vit.E=27.500mg; vit.K=1,375mg; vit.C=41,250mg; biotina=130,50mg; colina=75,625mg; vit.B9 fólico=825,00mg; inositol=27,500mg; niacina=13,750mg; vit.B5=6,875mg; vit.B6=2,063mg; vit.B2=2,750mg; vit.B1=2,750mg e vit.B12=4,120mg.

das gônadas, proposto por GUERRERO & SHELTON (1974) e validadas por WASSERMANN & AFONSO (2002). Foi coletado aleatoriamente um grama de intestinos de cada unidade experimental, com intuito de quantificar o número de coliformes totais e bactérias totais, conforme metodologia descrita por KONEMAN et al. (2001).

Os dados de desempenho produtivo que atenderam os pressupostos de normalidade e homogeneidade a 5% dos resíduos, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, foram submetidos à ANOVA, seguido por Tukey a 5%. Os dados de desempenho produtivo e proporção sexual foram submetidos ao Qui-quadrado (χ^2), utilizando o software computacional livre Biostat 5.0 (AYRES et al., 2007) e *Statistica*® 7.0 (Statsoft, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, constataram-se, na água de cultivo, os valores médios \pm desvio

padrão de $5,86 \pm 1,58$ mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido, $36,70 \pm 0,19$ μ S cm⁻¹ de condutividade, $74,98 \pm 1,00$ % de saturação de oxigênio dissolvido e $7,4 \pm 0,21$ de pH. Foram obtidos valores mínimos de 6,9; 0,14 μ S cm⁻¹ para pH e condutividade, respectivamente. Esses valores estão em conformidade para o cultivo de tilápia-do-Nilo, segundo BOYD & TUCKER (1998).

Verificou-se, durante o experimento, que houve oscilações na temperatura: valores mínimos pela manhã de 22°C e máximo de 26°C durante a tarde, sendo que a média foi 24,23°C. Em sistemas de recirculação, EL-SAYED & KAWANNA (2008) demonstraram que a temperatura ótima de conforto para tilápia é 28°C. Os valores de temperatura estavam abaixo do recomendado, porém, não houve diferença dessa variável entre os peixes alimentados com probióticos ou não. A época em que se realizou o experimento foi caracterizada como inverno na região do Oeste do Paraná. Apesar dessas temperaturas não desejáveis para a tilápia do Nilo, conforme relatam

SIFA et al. (2002), a temperatura letal para tilápias é variável de 11 e 8,4°C para a linhagem GIFT.

Entre os meses de março a abril, houve um decréscimo significativo nos valores observados da temperatura de cultivo, passando de 26°C para 24°C. Até a segunda quinzena desse mês, a temperatura estabilizou-se e, ao final da fase de reversão sexual, a temperatura chegou ao mínimo de 22°C. Uma das premissas da utilização de probióticos é que os organismos nos quais estão sendo administrados esses promotores de crescimento sejam submetidos a uma fonte de estresse físico, químico ou biológico para haver prováveis efeitos benéficos ao hospedeiro (LARA-FLORES et al., 2003; APÚN-MOLINA et al., 2009).

O peso final dos peixes alimentados com as formulações que não continham nenhuma bactéria foi superior ($P < 0,05$) que *Bacillus subtilis*, entretanto, comparando-os com os peixes que receberam na dieta a bactéria *Bacillus cereus*, pôde-se observar que não houve diferença entre eles. Analogamente, com os resultados obtidos neste trabalho, RIDHA et al. (2012), avaliando o potencial de dois probióticos em relação a um tratamento controle ao final de 99 dias de cultivo, observaram que não houve melhoria no ganho de peso. No entanto, ao final de 61 dias sem adicionar probióticos na alimentação dos peixes, os autores perceberam que a exposição prolongada pode surtir um estabelecimento da colonização dos probióticos e, com isso, uma melhoria nos processos digestivos e enzimáticos que ajudam a extrair nutrientes dos alimentos, portanto, interferindo positivamente no desempenho produtivo.

Esses resultados servem de informação para futuros trabalhos, em função disso, deve-se, portanto,

analisar o caso por um período mais prolongado, com o intuito de verificar se a colonização intestinal deste probióticos assegura um melhor crescimento.

Ao final do experimento, os peixes de todos os tratamentos ganharam em média 0,24g, o que representa um crescimento específico em média de 8% (Tabela 2). Comparativamente com os resultados obtidos por TACHIBANA et al. (2008), em que encontraram valores superiores aos encontrados no presente trabalho estudando a densidade de estocagem durante a fase de reversão sexual, observaram que o crescimento específico variou entre 14 e 18%. No entanto, LARA-FLORES et al. (2003), estudando a utilização de duas bactérias e um fungo como promotores de crescimento em tilápia do Nilo, obtiveram o percentual máximo 6,16% no crescimento específico, sendo ainda inferior aos valores obtidos neste estudo. Provavelmente, fatores ambientais como a temperatura da água abaixo do recomendado podem ter influenciado no crescimento dos alevinos na fase de reversão sexual durante o inverno no Oeste do Paraná.

A utilização ou não de probióticos em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo não influenciou no consumo de ração, conversão alimentar e sobrevivência ($P > 0,05$). A conversão alimentar dos peixes variou entre 1,00 e 0,93 (Tabela 2). Diferentemente do que foi reportado por MARENGONI et al. (2010) que, estudando o desempenho produtivo de tilápias vermelhas da linhagem Saint Peter, alimentadas com rações contendo níveis crescentes de probióticos em cultivo de águas mesohalina, observaram valores superiores variando entre 1,97 e 2,25.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de desempenho produtivo observados no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com diferentes probióticos durante a fase de reversão sexual.

Parâmetros	Bactéria			(F; p) ⁽²⁾
	Ausente	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
Peso final (g)	0,28 ^a ±0,01	0,23 ^b ±0,00	0,28 ^a ±0,01	7,64; 0,00321
Ganho de peso (g)	0,26 ^a ±0,01	0,21 ^b ±0,00	0,26 ^a ±0,01	7,64; 0,00321
CE (% dia ⁻¹) ⁽¹⁾	8,10 ^a ±0,13	7,50 ^b ±0,07	8,09 ^a ±0,14	8,39; 0,00210
Biomassa final (g)	11,00 ^a ±0,78	9,75 ^a ±0,37	11,10 ^a ±0,52	1,67; 0,21260
Consumo de ração (g)	9,28 ^a ±0,73	8,51 ^a ±0,74	9,05 ^a ±0,67	0,31; 0,73835
Conversão alimentar	1,00 ^a ±0,11	1,00 ^a ±0,08	0,93 ^a ±0,08	0,18; 0,83354
Sobrevivência (%)	88 ^a ±0,02	91 ^a ±0,02	89 ^a ±0,01	1,08; 0,35947

⁽¹⁾CE: Crescimento específico; ⁽²⁾F: Variável do teste, P: valores críticos.

As porcentagens verificadas para machos nas dietas ausentes, *B. subtilis* e *B. cereus*, foram de 84,47; 90,00 e 87,63%, respectivamente. Na proporção sexual entre machos e fêmeas, houve diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) em cada um dos tratamentos ($\chi^2=47,57$; $P < 0,0001$; para dieta ausente de probióticos; $\chi^2=62,41$; $P < 0,0001$; para dieta contendo *Bacillus subtilis*; $\chi^2=53,44$; $P < 0,0001$; para dieta contendo *Bacillus cereus*).

Observou-se que não houve associação entre a proporção sexual entre machos e fêmeas e adição de qualquer probiótico ($\chi^2=1,42$; $P=0,4926$). Esses resultados assemelham-se àqueles observados por MARENGONI et al. (2010), nos quais, avaliando a proporção sexual de alevinos de tilápia vermelha, linhagem Saint Peter, os autores verificaram que fatores bióticos e abióticos não afetaram na proporção sexual.

Os efeitos da excelente proporção sexual esperada, acima de 95% de monossexo de machos (WASSERMANN & AFONSO, 2002), atribuem-se à adição do hormônio andrógeno sintético masculinizante 17- α -metiltestosterona, porém, observou-se aproximadamente 87,33% de machos após a reversão sexual. Segundo DESPREZ et al. (2003), tilápias são caracterizadas por uma maturidade sexual precoce e uma alta eficiência reprodutiva, o que significa que, mesmo controlando a reversão sexual com uso de hormônios, a mínima porcentagem de fracasso na reversão resulta em superpopulação em cultivos comerciais (POPMA & GREEN, 1990; BORGES et al., 2005).

As contagens de bactérias totais e coliformes totais não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela adição de probióticos nas rações para alevinos de tilápia do Nilo ao final da reversão sexual (Tabela 3).

JATOBÁ et al. (2008), estudando potenciais probióticos em tilápia do Nilo, observaram

valores superiores de bactérias totais que variaram entre 7,68 para o tratamento sem adição e 8,06 para os peixes que foram submetidos à adição de probiótico, diferentemente dos encontrados no presente trabalho, os quais variaram entre 4.46 e 4,77log UFC mL⁻¹, respectivamente, para *Bacillus cereus* e o controle.

Provavelmente, o tempo de utilização de probióticos tenha influenciado na contagem de bactérias totais durante o cultivo, o que, segundo relata APÚN-MOLINA et al. (2009), é um dos fatores que influencia na colonização intestinal. Além disso, os probióticos utilizados *in vivo* foram isolados do intestino da mesma população de peixes em que seriam submetidos posteriormente ao um desafio, diferentemente do que foi realizado neste estudo. Além disso, conjuntamente a esta hipótese, estes valores podem ter sido diferentes devido ao mecanismo de inibição por exclusão competitiva por nutrientes, espaço ou especificidade da relação probiótico-hospedeiro, conforme relata GOMEZ-GIL et al. (2000).

CONCLUSÃO

O probiótico *Bacillus subtilis* não melhora o desempenho produtivo das tilápias do Nilo. Entre os dois probióticos estudados, recomenda-se o probiótico contendo *Bacillus cereus* C-3102, por não afetar negativamente a efetividade da reversão sexual e obter um melhor desempenho produtivo.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Protocolo 80/09.

REFERÊNCIAS

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão de bactérias totais e coliformes dos intestinos de alevinos de tilápia do Nilo, alimentadas com diferentes probióticos durante a reversão sexual.

Dietas	Bactérias totais (UFCx10 ³ g ⁻¹)	Coliformes totais (UFCx10 ³ g ⁻¹)
	⁽¹⁾ F=2,4783; P=0,09607	F=1,5380; P=0,22666
Ausente	4,773 ^a ±0,149	3,437 ^a ±0,037
<i>Bacillus subtilis</i>	4,532 ^a ±0,205	2,839 ^a ±0,029
<i>Bacillus cereus</i>	4,460 ^a ±0,130	2,876 ^a ±0,060

⁽¹⁾F: Variável do teste, P: valores críticos.

ALBUQUERQUE, D.M. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, linhagem GIFT. 2011. 38f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros) – Curso de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PR.

APÚN-MOLINA, J.P. et al. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, v.40, p.887-894, 2009.

AYRES, M. et al. *Biostat. Versão 5.0*. Belém, Pará, Sociedade civil Mamirauá; MCT-CNPq, 2007. 380p.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. *Pond aquaculture water quality management*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. 720p.

BORGES, A.M. et al. Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.2, p.153-159, 2005.

- Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v40n2/23822.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2012.
- CHANTHARASOPHON, K. et al. High potential probiotic *Bacillus* from gastro-intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Biotechnology**, v.10, n.6, p.498-505, 2011. Disponível em: <<http://sialert.net/abstract/?doi=biotech.2011.498.505>>. Acesso em: 29 set. 2012. doi: 10.3923/BIOTECH.2011.498.505.
- CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315976#>>. Acesso em: 01 set. 2010. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007.
- DESPREZ, D. et al. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. **Aquaculture**, v.216, p.55-65, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848602002764>>. Acesso em: 13 ago. 2012. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00276-4.
- EL-HAROUN, E.R. et al. Effect of dietary probiótico Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v.37, n.14, p.1473-1480, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x/full>>. Acesso em: 01 set. 2010. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x.
- EL-SAYED, A.F.M.; KAWANNA, M. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. **Aquaculture Research**, v.39, n.6, p.670-672, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x/pdf>>. Acesso em: 01 set. 2010. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x.
- FARZANFAR A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. **Federation of European Microbiology Societies Immunology and Medical Microbiology**, v.48, p.149-158, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x/pdf>>. Acesso em: 01 set. 2010. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food, 2002**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 01 set. 2010.
- GOMEZ-GIL, B. et al. The use and selection of probiotic bacteria for use the culture of larval aquatic organism. **Aquaculture**, v.191, p.259-270, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00431-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00431-2)>. Acesso em: 01 set. 2010.
- GUERRERO, R.D.; SHELTON, W.L. An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. **Progressive Fish Culturist**, v.36, p.56, 1974.
- JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1201-1207, 2008. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/pab/v43n9/15.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2012.
- KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v.274, p.1-14, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>>. Acesso em: 01 set. 2010. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.
- KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1760p.
- LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, p.193-201, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)>. Acesso em: 01 set. 2010.
- MARENGONI, N.G. et al. Desempenho produtivo de tilápia vermelha submetida à dieta contendo probiótico durante a alevinagem em água mesohalina. **Revista Archivos de Zootecnia**, v.59, n.227, p.403-414, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922010000300008>>. Acesso em: 01 set. 2010.
- NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v.29, n.1, p.2-14, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>>. Acesso em: 13 fev. 2012. doi:10.1016/j.fsi.2010.02.017.
- PEZZATO, L.E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbz/v31n4/13720.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2008.
- POPMA, T.J.; GREEN, B.W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds**: aquaculture production manual. Alabama: Auburn University, 1990. 15p.
- RIDHA, M.T.; AZAD, I.S. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, v.43, n.6, p. 843-852, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2011.02899.x/abstract>>. Acesso em: 13 fev. 2012. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02899.x.
- SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>>. Acesso em: 13 fev. 2012.
- SIFA, L. et al. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture**, v.249, p.123-129, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00068-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00068-6)>. Acesso em: 27 out. 2010.
- TACHIBANA, L. et al. Densidade de estocagem de pós-larvas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, n.4, p.483-488, 2008. Disponível em: <http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/55884_6437.PDF>. Acesso em: 28 jun. 2009.
- VAZOLLER, A. E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleosteos**: teoria e prática. Maringá: EDUEM, 1996. 169p.
- WASSERMANN, G.J.; AFONSO, L.O.B. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Ciência Rural**, v.32, p.133-139, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000100023>>. Acesso em: 8 fev. 2008.
- WEATHERLEY, A.H. **Growth and ecology of fish population**. Londres: Academic, 1972. 293p.