

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA NA DIETA SOBRE O CULTIVO DE
JUVENIS DE ROBALO PEVA (*Centropomus parallelus* Poey, 1860).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Aqüicultura.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Juliet Kiyoko Sugai

Rodrigo Matos de Souza

**Florianópolis
2007**

Souza, Rodrigo Matos

Influência da aplicação de bactéria ácido láctica na dieta sobre o cultivo de juvenis de robalo – peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860)./ Rodrigo Matos de Souza: UFSC, 2007, 42 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós – Graduação em Aqüicultura, Florianópolis, 2001.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Juliet Kiyoko Sugai

1. Robalo 2. Bactéria ácido-láctica 3. Proteases 4. Estresse 5. Bactérias patogênicas.

Influência da aplicação de probióticos na dieta sobre o cultivo de juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860).

Por

RODRIGO MATOS DE SOUZA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira - *Orientador*

Dra. Débora Machado Fracalossi

Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

Ao meu grande e bom Deus...

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Juliet Kiyoko Sugai por todo conhecimento gerado, paciência, e ajuda prestada na execução desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira pela valiosa oportunidade de trabalhar, participar do programa de Pós – Graduação e executar este trabalho nas dependências do LAPMAR.

Ao Msc. José Luiz P. Mourião e equipe (Celso Buglione Neto e Felipe Nascimento Vieira) do Setor de Microbiologia do LCM por todo conhecimento, material e amizade ao longo destes anos.

Aos membros desta banca Prof^a. Dra. Débora M. Fracalossi, Prof. Dr. Ernani Sant' Anna e Prof. Dr. Roberto D. Bianchini por aceitarem participar da banca examinadora com um curtíssimo período de tempo...

Aos Professores, Servidores e colegas do LAPMAR e PG – AQI por todo conhecimento, ajuda e bons momentos ao longo deste período.

Ao amigo e colega Thiago A. Soligo grande incentivador na escolha da área deste curso de mestrado.

Às pessoas que amo...

À CAPES pela bolsa fornecida ao aluno

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1-INTRODUÇÃO	10
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1-Problemas na produção de juvenis de peixes marinhos	11
2.2-Microbiologia na aquicultura	11
2.3-Nutrição	12
2.4-Enzimas digestórias	12
3-OBJETIVOS	14
3.1-Objetivo geral	14
3.2-Objetivos específicos	14
4-ARTIGO - SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA UTILIZAÇÃO EM CULTIVO DE JUVENIS DE ROBALO-PEVA (<i>Centropomus parallelus</i> Poey, 1860).....	15
RESUMO	15
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
Material biológico e isolamento	17
Seleção de bactérias probióticas	18
Ensaio in vitro	18
Antagonismo frente à patógenos	18
Crescimento in vitro.....	18
Ensaio in vivo	18
Preparo da dieta.....	19
Ensaio de patogenicidade.....	19
Avaliação das BAL no trato digestório de juvenis	19
Antagonismo frente à patógenos	19
Análise estatística	19
RESULTADOS	19
Isolamento e seleção in vitro.....	19
Seleção in vivo	20
DISCUSSÃO	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5-ARTIGO - INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE PROBIÓTICO NO CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA, ATIVIDADE DE PROTEASES DIGESTÓRIAS E RESISTÊNCIA AO ESTRESSE EM JUVENIS DE ROBALO-PEVA <i>Centropomus parallelus</i> , POEY, 1860	25
RESUMO	25
1-INTRODUÇÃO	25
2-MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1-Local de estudo.....	27
2.2-Material biológico e delineamento experimental.....	27
2.3-Alimentação	27
2.3.1-Protocolo alimentar	27
2.3.2-Preparo da dieta.....	27

2.4-Coleta de amostras	28
2.5-Avaliação microbiológica	28
2.6-Avaliação enzimática	28
2.7-Teste de estresse.....	29
2.8-Análise estatística	29
3-RESULTADOS	30
4-DISSCUSSÃO	32
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
6-CONCLUSÕES GERAIS	37
7-CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

No cultivo de peixes marinhos, altas taxas de mortalidade são atribuídas a problemas nutricionais, infecções bacterianas, entre outros. Os microrganismos são de fundamental importância na manutenção da sanidade e estabilidade nos sistemas de produção na aquicultura. Podem ter efeitos negativos como a transmissão de doenças e positivos através dos probióticos, que podem modificar a associação do peixe com a comunidade microbiana, otimizar o uso da alimentação auxiliando na digestão, estimular o sistema imune do hospedeiro e melhorar a qualidade do efluente. O objetivo geral desta pesquisa foi selecionar bactérias ácido-láticas, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, bem como verificar os efeitos da aplicação destas bactérias como suplemento alimentar sobre o cultivo de juvenis do robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey), durante o desmame (transição do alimento vivo para dieta seca). Não foram obtidos resultados positivos para crescimento, sobrevivência e qualidade de água. A maior resistência ao teste de estresse, produção de protease com possíveis efeitos nutricionais e consequentemente fisiológicos, habilidade em inibir patógenos e consequentemente promover bem estar, indicam *Lactobacillus plantarum* como tratamento probiótico em cultivo de robalo, melhorando a qualidade dos peixes, tornando-os resistentes ao cultivo, transferências, repovoamentos e como uma válida alternativa para o uso de drogas e antibióticos na piscicultura marinha.

Palavras chave: robalo, bactérias ácido - láticas, proteases, estresse e bactérias patogênicas.

ABSTRACT

INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA NA DIETA SOBRE O CULTIVO DE JUVENIS DE ROBALO-PEVA (*Centropomus parallelus* Poey, 1860).

In the marine fish culture, high rates of mortality are attributed to nutritional problems, bacterial infections, among others. The microorganisms are of fundamental importance in the maintenance of sanity and stability in the aquaculture production systems. They can have negative effects such as disease transmissions and positive effects through probiotics, which can modify the fish association with the microbiologic community, optimize the use of the food helping in the digestion, stimulate the immune system of the host and improve the quality of the effluent. The general aim of this research was to select lactic acid bacteria through the test in vivo and in vitro as well as verify the effects of the application of this bacteria as food supply on the juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey) culture, during the weaning (transition from the living food to a dry diet). Results for the growth, survival and water quality were not achieved. A better resistance to the stress test, protease production with possible nutritional effects and consequently physiologic, ability of inhibiting pathogens and consequently promoting welfare, indicates *Lactobacillus plantarum* as probiotic treatment in snook culture, improving the fish quality, making them resistant to the culture, transfers, resettlement and as a valid alternative for the use of drugs and antibiotics in the marine fish culture.

KEY WORDS: snook, weaning, protease production, infectious diseases.

1-INTRODUÇÃO

A captura e a produção mundial de peixes em 2004 ficaram em torno de 106 milhões de toneladas. Na aqüicultura, a piscicultura marinha produziu 18,9 milhões de toneladas em 2005, o que representa 39,5% do total de peixes produzidos por cultivo (FAO, 2006). O crescimento experimentado pela aqüicultura na atualidade parece decorrer da estagnação da captura de peixes, sobrepesca e suprimento da crescente demanda (TACON, 2003; NATHAN *et al.*, 2006).

Se considerarmos a extensão da costa brasileira e seus vastos recursos, as perspectivas para o desenvolvimento da piscicultura marinha são das mais promissoras. Segundo CERQUEIRA (2004), para que a produção seja incrementada é necessário desenvolver tecnologia apropriada para a propagação artificial de nossas espécies, de modo a promover a oferta de alevinos e ao mesmo tempo desenvolver técnicas de cultivo intensivas.

No Brasil, pouca atenção tem sido dada ao problema, não havendo qualquer registro de produção significativa de peixes marinhos, através do cultivo, em nosso país (CERQUEIRA, 2002). Há em algumas regiões do país a engorda de juvenis capturados no ambiente natural e cultivados de forma extensiva, porém de forma pouco expressiva.

No sul do Brasil, desde 1990, trabalhos vem sendo realizados no Laboratório de Piscicultura Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina, principalmente com a espécie *Centropomus parallelus* (robalo-peva). Trata-se de uma espécie catádroma, eurihalina, podendo alcançar 5 kg. Sua distribuição inclui áreas tropicais e subtropicais da costa atlântica das Américas, desde os Estados Unidos até o sul do Brasil (RIVAS, 1986).

Entre as características que despertam o interesse na utilização do robalo temos: capacidade de suportar altas densidades de estocagem, resistência à ampla variação de parâmetros físico-químicos da água, possui grande valor para pescarias esportivas, tem ótimas características organolépticas e preço aceitável no mercado (CHAPMAN *et al.*, 1982; TUCKER *et al.*, 1985; TUCKER e JORY, 1991). A maior restrição para a sua produção em larga escala é a dificuldade de produzir alevinos em quantidade suficiente (TEMPLE *et al.* 2004). Segundo TUCKER (1987), a grande mortalidade na larvicultura do robalo (*Centropomus sp.*) é um dos maiores obstáculos para se obter produção massiva de juvenis.

2–REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Problemas na produção de juvenis de peixes marinhos.

Geralmente é aceito que a dificuldade em produzir juvenis em quantidade suficiente para o cultivo é o maior gargalo no desenvolvimento da piscicultura marinha (TUCKER, 1998; TEMPLE et al., 2004; SANTAMARIA et al., 2004). Segundo CAHU e ZAMBONINO-INFANTE (2001) e KOVEN et al., 2001) a nutrição é considerada uma importante questão na produção de juvenis de peixes marinhos.

Outro problema responsável por grandes perdas no cultivo intensivo de peixes são as infecções bacterianas, as quais são consideradas problemas secundários relacionados ao estresse pela variação de temperatura, manejo, qualidade de água, parasitas, tratamento quimioterápico, entre outros (DIXON, 1991). VERSCHUERE *et al.* (2000) enfatizam a necessidade de desenvolver estratégias de controle microbiológico na aquicultura, uma vez que o desencadeamento de doenças é reconhecido como um significativo limitante para a produção.

2.2-Microbiologia na aquicultura

Os microrganismos encontrados na água, estrutura de cultivo, ar, alimento e animais são de fundamental importância na manutenção da sanidade e estabilidade nos sistemas de produção em aquicultura, podendo ter efeitos positivos e negativos. Os efeitos positivos podem ser obtidos através dos probióticos. Estes são definidos como um conjunto microbiológico vivo que pode ter efeito benéfico para o hospedeiro por modificar a associação deste com a comunidade microbiológica e o meio ambiente competindo por locais de adesão, otimizar o uso da alimentação auxiliando na digestão, acentuar o valor nutricional como fonte de macro e micronutrientes, estimular o sistema imune do hospedeiro e melhorar a qualidade do efluente (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

Os efeitos negativos incluem a transmissão de doenças e mortalidade em sistemas de cultivo, através de bactérias patogênicas oportunistas, particularmente *Vibrio* sp. que fazem parte da microbiota de peixes marinhos, e consumo de grandes quantidades de oxigênio (MUROGA *et al.*, 1987, KRAXBERGER-BEATTY et al., 1990; HOROWITZ e HOROWITZ, 2002; AUSTIN e ZHANG, 2006). Além disso, há implicações negativas no uso de antibióticos ou desinfetantes, como tratamento profilático ou terapêutico, relacionadas com o aumento da resistência bacteriana a estes compostos, saúde humana e o meio ambiente (VINE *et al.*, 2004; GARCIA e MASSAM, 2004; RAMÍREZ *et al.*, 2005).

Entre os fatores que influenciam o desenvolvimento microbiológico em sistemas de aquicultura, encontram-se os parâmetros da qualidade de água como salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, quantidade e qualidade da alimentação, além de práticas como ciclos de cultivo descontínuo e limpeza ou desinfecção dos tanques.

Assim, SUGITA *et al.* (2002) e RAMIREZ *et al.* (2005) sugerem que cepas bacterianas isoladas do intestino de juvenis da própria espécie possuem ótimo potencial para ser utilizado como

probiótico devido à atividade antimicrobiana, podendo prevenir infecções e enfermidades em aquicultura, além de apresentar adaptabilidade muito maior às condições intestinais e às condições de origem.

Inúmeros estudos têm demonstrado o interesse no uso de bactérias ácido-láticas (BAL) e de seus produtos metabólicos como potenciais probióticos em aquicultura (GATESOUBE, 1994; RINGO e GATESOUBE, 1998; GATESOUBE, 1999) como aumentar o valor nutricional da dieta para larvas de “turbot” *Scophthalmus maximus* (GATESOUBE, 1991) e aumentar o crescimento populacional em cultivo de rotíferos (PLANAS *et al.*, 2004). Tem sido utilizada também em desinfecção de náuplios de *Artemia* (GATESOUBE, 2002), inibir o crescimento de bactérias do gênero *Vibrio* através de compostos inibitórios (VASQUEZ *et al.*, 2005), aumentar sobrevivência, uniformidade de tamanho e taxa de crescimento específico em larvas de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), “spotted seatrout” (*Cynoscion nebulosus*) e tainha (*Mugil cephalus*) (KENNEDY *et al.* 1998) e aumentar a resposta imunológica em truta arco-íris (NIKOSKELAINEN *et al.*, 2003).

2.3-Nutrição

Altas mortalidades, baixas taxas de crescimento e altos custos de produção que ocorrem na fase larval e juvenil, durante o período de desmame, são alguns dos principais problemas no desenvolvimento do cultivo intensivo de peixes marinhos (PLANAS e CUNHA, 1999; SANTAMARIA *et al.*, 2004).

Segundo CAHU e ZAMBONINO-INFANTE (2001), o desmame é conhecido como a substituição do alimento vivo pelo inerte, que é realizado após algumas semanas de larvicultura.

KOLKOVSKI e TANDLER (1995) apontam que o baixo desempenho das micro-dietas está relacionado à inadequada incorporação de nutrientes devido a uma pobre ingestão, digestão e /ou absorção.

As diferenças funcionais e morfológicas existentes entre as espécies e durante o desenvolvimento ontogenético, progressiva diferenciação e desenvolvimento dos órgãos e suas funções até a fase adulta, podem explicar a limitação em aceitar e assimilar a composição nutricional da dieta seca (CIVERA-CERECEDO *et al.*, 2004).

Assim, para facilitar o desenvolvimento de dietas adequadas para o cultivo de peixes marinhos, LAZO (2000) sugere entre outros itens, avaliar dietas que estimulem a secreção de enzimas digestórias e a utilização de probióticos que aumentem a eficiência da digestibilidade.

2.4-Enzimas digestórias

A digestão dos nutrientes ocorre no trato gastrointestinal e é realizada por diferentes classes de enzimas estomacais, pancreáticas e intestinais, além da absorção dos nutrientes por células intestinais. A atividade de protease ácida é mais concentrada no estômago, ocorrendo devido à ativação, em meio ácido, do pepsinogênio em pepsina. As células exócrinas do pâncreas sintetizam e secretam no intestino um grande número de enzimas digestórias (glicosidases, lipases e proteases)

na forma inativa de zimogênios. Estas proteases atuam também em pH alcalino após serem ativadas por tripsina, que é ativada através da enteroquinase, enzima secretada por células intestinais. Estas enzimas encontradas no trato gastrointestinal são muitas vezes complementares e levam à total digestão dos nutrientes da dieta permitindo sua absorção (ZAMBONINO-INFANTE e CAHU, 2001).

As enzimas digestórias, proteolíticas, amilolíticas e celulolíticas, além de produzidas em vários órgãos digestórios também podem ter origem no alimento vivo ou nas bactérias que compõem a microbiota do peixe e variaram em quantidade e qualidade conforme a espécie bacteriana (LAZO, 2000; SAHA *et al.* (2006)

A atividade de enzimas digestórias e consequente utilização do alimento pode ser melhorado através da suplementação de bactérias, inclusive ácido-lática, à dieta (DE SCHRIJVER e OLLEVIER, 2000; WANG e XU, 2006)

3-OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral

Verificar se a utilização de probióticos pode ter efeitos positivos no cultivo de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus* POEY).

3.2-Objetivos específicos

Verificar o efeito da aplicação de cultura de bactéria láctica na ração sobre a colonização e a inibição do crescimento de bactérias patogênicas no trato digestório de juvenis do robalo-peva.

Verificar a influência do potencial probiótico sobre o crescimento, a sobrevivência, atividade de proteases digestórias e resistência ao estresse de juvenis do robalo-peva.

Esta dissertação foi dividida em dois artigos redigidos conforme normas das revistas.

O artigo intitulado **Seleção de bactérias probióticas para utilização em cultivo de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*)** será submetido ao Boletim do Instituto de Pesca - SP.

O artigo intitulado **Influência da aplicação de probiótico no crescimento, sobrevivência, atividade de proteases digestórias e resistência ao estresse em juvenis de robalo peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860** será submetido à revista Aquaculture – Elsevier, Amsterdam.

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA UTILIZAÇÃO EM CULTIVO DE JUVENIS DE ROBALO-PEVA (*Centropomus parallelus* Poey, 1860)

RESUMO

Infecções bacterianas, particularmente *Vibrio spp*, são responsáveis por grandes mortalidades no cultivo intensivo de peixes. Geralmente estas são consideradas problemas secundários relacionados ao estresse causado durante o cultivo. Um método que está sendo aceito na indústria da aquicultura é a utilização de bactéria probiótica para controlar eventuais patógenos, além de outros efeitos fisiológicos favoráveis ao hospedeiro. O objetivo deste estudo foi isolar e selecionar bactérias ácido-láticas para serem utilizadas como probiótico em cultivo de robalo, avaliando a capacidade de colonizar o trato digestório dos peixes e inibir possíveis patógenos *in vitro* e *in vivo*, tempo de permanência na dieta e sinais clínicos de patogenicidade. Foram selecionadas três cepas distintas, das quais duas apresentaram inibição de patógenos *in vitro*. A cepa que apresentou melhor desempenho (*Lactococcus spp.*) foi utilizada nos ensaios *in vivo*, utilizando *Lactobacillus plantarum* como comparativo. Os resultados demonstram capacidade de inibir bactérias vibrionáceas, boa colonização e praticidade de aplicação através da dieta, permanecendo viáveis durante um mês sob refrigeração. A utilização de probióticos é uma alternativa na prevenção de problemas gerados pela intensificação da produção de qualquer espécie de organismo aquático, e o isolamento de cepas probióticas dos próprios animais e do meio em que estão, pode ajudar na solução dos problemas gerados no cultivo intensivo e repovoamento de organismos aquáticos.

PALAVRAS CHAVE: *Vibrio spp*, bactérias ácido láticas, probiótico.

SELECTION OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA TO USE IN FAT SNOOK (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) FRIES CULTURE

ABSTRACT

Bacterial infections, *Vibrio spp.* particularity, are responsible for high rate of mortality in intensive fish culture. These are usually considered secondary problems related to stress caused during the culture. A method which has been accepted in the aquaculture industry is the use of probiotic bacteria to control eventual pathogens besides others physiologic effects to the host. The aim of this study was isolate and select lactic acid bacteria to be used as probiotic in snook culture, evaluating the capacity to colonize the digestive treats of the fish and inhibit possible pathogens *in vitro* and *in vivo*, remaining time on the diet and clinical signals of patogenicity. Three distinct strains were selected from which two showed pathogen inhibition *in vitro*. The kind which that showed the best performance (*Lactococcus spp.*) was utilized in the *in vivo* test, in comparison with *Lactobacillus plantarum*. The results demonstrate capacity to inhibit *Vibrio* bacteria, good colonization and practicality in the application through the diet, remaining viable during a month under refrigeration. The probiotic utilization is an alternative in preventing the problems generated by the production intensification of any aquatic organism, and the isolation of probiotic strain of the animals themselves and of the environment they are, can help in the solution of the problems generated in the intensive culture and resettlement of aquatic organisms.

KEY WORDS: *Vibrio spp*, lactic acid bacteria, probiotic

INTRODUÇÃO

Os Centropomideos são de interesse recreativo e valioso para as pescarias comerciais e esportivas, sendo utilizados em repovoamentos e em cultivos experimentais (CHAPMAN *et al.*, 1982; TUCKER, 1987; KENNEDY *et al.*, 1998, BRENNAN *et al.*, 2006).

A maior restrição para a piscicultura em larga escala e estável é a dificuldade em produzir juvenis em quantidade suficiente para o cultivo (HJELM *et al.*, 2004), inclusive de robalo (*Centropomus parallelus*) onde (TEMPLE *et al.*, 2004). Segundo TUCKER (1987), a grande mortalidade na larvicultura do robalo (*Centropomus* sp.) é um dos maiores obstáculos para se obter produção massiva de juvenis.

Parte destas perdas no cultivo intensivo de peixes marinhos são devido a infecções bacterianas que são consideradas problemas secundários relacionados ao estresse como variação de temperatura, manejo, qualidade de água, parasitas, tratamento quimioterápico, entre outros (DIXON, 1991). Segundo MUROGA *et al.* (1987) e BARTLEY *et al.*, 2006, as bactérias patogênicas oportunistas, particularmente *Vibrio spp.*, fazem parte da microbiota de peixes marinhos e são agentes causadores de doenças e mortalidade maciça em sistemas de cultivo ou em espécies nativas no habitat natural através de repovoamentos. Como o *Vibrio harveyi* em robalo (KRAXBERGER-BEATTY *et al.*, 1990) e em demais organismos aquáticos marinhos (AUSTIN e ZHANG, 2006).

Quando antibióticos ou desinfetantes são utilizados como tratamento profilático ou terapêutico para eliminar colônias de bactérias de um determinado local, as patogênicas que são altamente competitivas, vão recompor a maior parte da população de bactérias após a aplicação do produto (MAEDA, *et al.*, 1997). São capazes também de sobreviver em resposta ao antibiótico por carregarem genes de resistência ou pelo emprego de dosagens inadequadas. Além disso, há implicações negativas relacionadas com a saúde humana e o meio ambiente (VINE *et al.*, 2004; GARCIA e MASSAM, 2004).

Métodos preventivos de manejo como quarentena, procedimentos de diagnóstico e tratamento, adoção de práticas responsáveis de manejo que minimizem a exposição dos organismos a agentes causadores de doenças ou estressores, bem como certificação de que os peixes estejam livres de infecções virais, bacteriana ou de parasitas minimizam a perda de peixes por doenças e com mínimo impacto para outras espécies do local (BLANKENSHIP e LEBER, 1995; KENNEDY *et al.*, 1998; BARTLEY *et al.*, 2006). Além de reduzir o uso de antibióticos, uma reconhecida ameaça as áreas costeiras que pode causar severos danos ecológicos, como controle de doenças em aqüicultura. (GILDBERG *et al.*, 1997).

Um método que está sendo aceito na indústria da aqüicultura é a utilização de bactéria probiótica para controlar eventuais patógenos (GOMEZ-GIL *et al.*, 2000; OLAFSEN, 2001), além de outros efeitos fisiológicos favoráveis ao hospedeiro (FULLER, 1992).

Segundo GATESOUBE (1999), probiótico é todo microorganismo vivo que suplementado via alimentação, gera benefícios ao hospedeiro regulando seu balanço microbiano intestinal.

Inúmeros estudos têm demonstrado o interesse no uso de bactérias ácido láticas (BAL) como potenciais probióticos em aqüicultura. GATESOUBE (1991) conseguiu melhorar o valor nutricional da

dieta para larvas de “turbot” (*Scophthalmus maximus*), GILDBERG *et al.* (1997) obteve um aumento na resistência a doenças em bacalhau “Atlantic cod” (*Gadus morhua*) e KENNEDY *et al.* (1998) aumentaram a sobrevivência, uniformidade de tamanho e taxa de crescimento específico em larvas de robalo flecha (*Centropomus undecimalis*), “spotted seatrout” (*Cynoscion nebulosus*) e tainha (*Mugil cephalus*). VÁZQUEZ *et al.* (2005) controlou a microbiota patogênica em peixes e CARNEVALI *et al.* (2006) obteve um aumento no bem estar e crescimento de juvenis do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*).

Diversos autores têm demonstrado que bactérias ácido-láticas fazem parte da microbiota do trato digestório de peixes (RINGO e GATESOUBE, 1998), sendo possível manter uma grande população ou colonização através da ingestão regular junto com a alimentação. A utilização de BAL na forma de tratamento pode ser importante para obter peixes saudáveis e com qualidade. Entretanto, outros estudos apontam a patogenicidade de BAL do gênero *Lactococcus* em muitas espécies de peixes, como uma emergente doença que causa importantes perdas econômicas na aquicultura de água doce e marinha (RINGO e GATESOUBE, 1998; VENDRELL *et al.*, 2006).

Segundo SUGITA *et al.* (2002) e VINE *et al.* (2004) é essencial conhecer a origem bacteriana, sendo preferível o uso de linhagens isoladas do próprio hospedeiro, por apresentarem maior segurança (não patogênicas) e habilidade em sobreviver no trato gastrointestinal (resistência a sais biliares, baixos pHs e proteases).

Usualmente, testes de antagonismo frente à patógenos *in vitro*, baseados na produção de compostos inibitórios ou na competição por nutrientes, são utilizados para selecionar potenciais bactérias probióticas (GILDBERG *et al.*, 1995; HUYS *et al.*, 2001; VINE *et al.*, 2004a; VÁZQUEZ *et al.*, 2005). Outros critérios utilizados para selecionar cepas são os testes *in vivo*, que são considerados um dos mais importantes, por demonstrar os efeitos no hospedeiro como na eliminação ou inibição de linhagens patogênicas, adesão ao muco intestinal e consequente colonização, produção de compostos benéficos, verificação da patogenicidade do potencial probiótico, análise custo benefício, além de permanecer estável sob condições de armazenamento e estocagem (GOMEZ-GIL *et al.*, 2000; HUYS *et al.*, 2001; VINE *et al.*, 2004; BALCÁZAR *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi isolar e selecionar BAL, através de métodos *in vitro* e *in vivo*, para serem utilizadas como probiótico em cultivo de robalo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico e isolamento

Juvenis saudáveis de robalo ($12,33 \pm 0,8$ g, n=6) provenientes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina foram submetidos ao jejum de 24 h, para esvaziamento gastrointestinal, antes de serem sacrificados por choque térmico (resfriamento em mistura de gelo e água).

O isolamento das BAL foi realizado através da adaptação dos métodos descritos por MUROGA *et al.* (1987) e RAMÍREZ *et al.* (2005) com a imersão dos juvenis de robalo em solução de formol 10%, para remover bactérias aderidas à superfície sem afetar as bactérias internas, sendo posteriormente enxaguados com solução salina estéril (32 ‰).

Os exemplares foram dissecados assepticamente sendo o trato gastrointestinal removido rapidamente e enxaguado com solução salina estéril (32 ‰). Cada amostra foi homogeneizada com a mesma solução estéril (1:1; peso /volume) e plaqueada em diluições sucessivas (1:10) em Agar MRS (Difco) com 2 % de NaCl e 0,5 % de azul de anilina como indicador. As placas foram incubadas por 48 h. a 30 °C em estufa para posterior classificação das colônias viáveis

Seleção de bactérias probióticas

As cepas foram selecionadas e classificadas de acordo com a morfologia das colônias viáveis, pelo método de coloração de Gram, teste de antagonismo frente à patógenos e crescimento *in vitro*. A cepa que apresentou melhor desempenho foi avaliada quanto à patogenicidade, colonização e inibição do crescimento de bactérias patogênicas *in vivo* em juvenis de robalo - peva.

Ensaio *in vitro*

Antagonismo frente à patógenos

Neste teste qualitativo foi utilizada a técnica de halo de difusão para verificar a atividade antibacteriana das BAL frente à patógenos. Este método é utilizado para averiguar o potencial antimicrobiano *in vitro* das candidatas probióticas (HJELM *et al.*, 2004). Segundo VASEEHARAN e RAMASAMY (2003) atividade antibacteriana é definida como a zona inibitória de crescimento formada ao redor do disco. Foi considerada formação de halo de inibição distâncias superiores a 5 mm.

Cada cepa isolada de BAL foi incubada em 10 mL. de meio MRS líquido a 30 °C por 48 h. em agitação contínua. Posteriormente foi realizado o plaqueamento, por semeadura total em placas de Petri, com inóculo de 1×10^7 UFC /mL, e incubado por 48 h. a 30 °C. Das placas foram retirados pequenos discos do meio MRS com as colônias de BAL e sobrepostas na superfície do meio Agar TSA (Difco) recém plaqueados com *Vibrio harveyi* (2343 ATCC) e *alginoliticus* (2068 ATCC), indentificados molecularmente. As placas contendo estes meios com as culturas bacterianas foram incubadas por 24 h. a 30 °C. A avaliação foi registrada pela presença ou ausência do halo de inibição ao redor dos discos de Agar segundo VINE *et al.* (2004 a)

Crescimento *in vitro*

Foi quantificado o número total de colônias viáveis das BAL crescidas em meio líquido MRS durante 48 h. a 30 °C, para viabilizar a produção de grandes quantidades de probiótico em um menor intervalo de tempo (MADIGAN *et al.*, 2004). Os inóculos foram semeados em Agar MRS através de diluições seriadas conforme a metodologia acima descrita durante 48 h. a 30 °C e o resultado foi expresso em UFC /mL.

Ensaio *in vivo*

Juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) ($11,3 \pm 1,7$ g) foram distribuídos em 9 tanques cilíndricos de 100 L. na proporção de 15 peixes por tanque, com temperatura controlada através de termostatos, aeração, fluxo contínuo de água e fotoperíodo de 12 h. Os valores de pH e amônia total foram verificados semanalmente através de pHmetro digital e kit colorimétrico (Tetra test – Germany), respectivamente. Os tanques eram sifonados diariamente após a última alimentação.

Os peixes foram aclimatados por 10 dias e submetidos a três tratamentos em triplicata por um período de 30 dias. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09 h. e 16 h.) até saciedade

aparente com ração comercial seca sem presença de BAL no controle e suplementadas, nos demais tratamentos, com cultura de *Lactococcus spp.* (isolado do trato digestório de robalo) ou *Lactobacillus plantarum* (CPQBA-007-07), com grande capacidade em inibir o crescimento *in vitro* de *V. harveyi* (VIEIRA *et al.*, 2006).

Preparo da dieta

A dieta comercial extrusada, 50 % de proteína bruta e 7 % de lipídio, foi suplementada através da aspersão das culturas bacterianas (1×10^8 UFC/mL) crescidas previamente em meio líquido. A dieta controle foi aspergida com o mesmo meio líquido sem adição de bactérias. As dietas foram mantidas em estufa a 30 °C por 48 h. para o crescimento bacteriano e secagem da ração. E posteriormente conservadas sob refrigeração a 4 °C durante o período experimental. Foram realizados plaqueamentos em meios sólidos para verificação das colônias viáveis na ração, no início e ao final do experimento.

Ensaio de patogenicidade

Durante e ao final do período experimental foram verificadas diariamente a ocorrência de mortalidade ou de sinais clínicos como letargia, anorexia, natação errática, exoftalmia, hemorragia na região ocular, bucal e nadadeiras e ao final do experimento quanto à ocorrência de hemorragia nos órgãos internos. Estes sinais clínicos segundo VENDRELL *et al.* (2006) são típicos de Lactococosis em peixes marinhos ou de água doce ou de *Lactobacillus spp.* em peixes (RINGO and GATESOUBE, 1998).

Avaliação das BAL no trato digestório de juvenis

Amostragens de 3 juvenis por tanque foram realizadas, no início e ao final do período experimental e após 24 h. de jejum para esvaziamento intestinal, com a finalidade de verificar a colonização das BAL, fornecida através de ração, bactérias patogênicas (*Vibrio spp.*) e sua conseqüente inibição no trato digestório.

Os tratos gastro-intestinais foram macerados e plaqueados conforme metodologia descrita anteriormente em meio MRS com 2 % de NaCl e azul de anilina, para BAL, ou em placas com meio TCBS (Difco), para *Vibrio sp.*, e incubadas a 30°C por 24 h. para posterior contagem de colônias totais viáveis em placas, expressa como UFC /g de trato.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software STATISTICA. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett de homogeneidade de variâncias. Após, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) com nível de significância a 5 % e as diferenças de médias detectadas através do teste de Tukey. Os dados foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ antes de serem analisados. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

RESULTADOS

Isolamento e seleção *in vitro*

Foram isoladas 3 colônias distintas de BAL com coloração e morfologia apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação, coloração Gram, morfologia e formação de halos de inibição frente à *Vibrio Harvey* e *V. alginolyticus* das cepas de BAL isoladas do trato gastrointestinal de robalo-peva.

Cepa	Coloração Gram	Morfologia	Halo de inibição	
			<i>Vibrio harvey</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
1	+	Cocos (pares)	+	+
2	+	Cocos	+	+
3	+	Bastonete	-	-

No ensaio de antagonismo frente à patógenos *in vitro*, duas das três cepas isoladas do trato digestório de juvenis de robalo apresentaram halo de inibição frente às duas bactérias patogênicas avaliadas (*Vibrio harvey* e *Vibrio alginolyticus*) conforme Tabela 1 e Figura 1.



Figura 1. Imagem do halo de inibição frente à *Vibrio harvey* * e *Vibrio alginolyticus* ** das três cepas isoladas do trato gastrointestinal de *C. parvella*. Foi considerada formação de halo de inibição distâncias superiores a 5 mm.

A contagem total de crescimento em meio sólido MRS durante 48 h a 30 °C das cepas 1 e 2 que apresentaram atividade antibacteriana, foi de 2×10^7 e 3×10^4 UFC/g, respectivamente.

Os resultados obtidos pela cepa 1 no ensaio de antagonismo e o crescimento total final em meio sólido MRS mais rápido em comparação as demais, indicam esta cepa como potencial probiótico. Pois além de inibir potenciais patógenos, facilitam a produção em larga escala do produto para uso em cultivos comerciais.

Seleção *in vivo*

No ensaio de seleção *in vivo*, as avaliações microbiológicas realizadas no trato digestório dos juvenis no início do experimento não apresentaram colonização de BAL, entretanto a contagem total de bactérias do tipo *Vibrio spp.* ficou em $1 \times 10^7 \pm 9 \times 10^6$ UFC/g (média \pm DP).

As contagens totais de colônias de *Lactococcus spp.* e *Lactobacillus plantarum* nas diferentes dietas durante o armazenamento por 30 dias a 4 °C foram reduzidas em 3 % e 4 %, respectivamente. O número de colônias viáveis de BAL nas dietas ao final do experimento foi de 3×10^8 UFC/g para *Lactococcus spp.* e 4×10^8 UFC /g para *Lactobacillus plantarum*.

Os tratamentos onde as bactérias lácticas foram adicionadas à dieta não apresentaram mortalidade ou sinais de patogenicidade típicos de BAL (doenças causadas por *Lactobacillus spp.* ou *Lactococcus spp.*).

A colonização de BAL ao trato digestório do robalo e sua habilidade antagonística frente às bactérias vibrionáceas estão demonstradas na Figura 2. Os tratamentos suplementados com as bactérias probióticas não diferiram estatisticamente na colonização final do trato digestório. Já o controle, que não foi alimentado com ração suplementada com as bactérias, não apresentou

colonização de BAL, diferindo estatisticamente dos tratamentos que receberam BAL. Este mesmo controle apresentou contagens superiores de bactérias patogênicas do tipo *Vibrio spp.* sendo estas superior aos tratamentos que receberam ração suplementada com as bactérias isoladas.

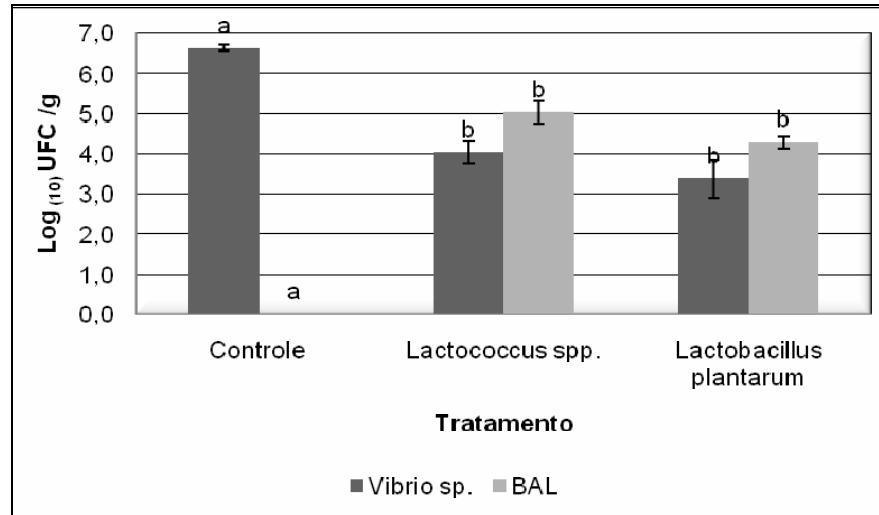


Figura 2. Colonização de BAL e vibriónáceas no trato digestório dos juvenis de robalo – peva alimentados com a dieta controle e as suplementadas com *Lactococcus spp.* e *Lactobacillus plantarum* ao final do período experimental. Resultados apresentados como média \pm DP. As letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água entre os tratamentos não diferiram estatisticamente. A temperatura foi de $26 \pm 0,5$ °C, fluxo contínuo de água de 10 L. /h., salinidade de 32 ‰, pH entre 7,8 e 8,1 e amônia total inferiores a 0,25 mg/L.

DISCUSSÃO

Na escolha dos probióticos, a capacidade de adesão e conseqüente colonização das bactérias no trato gastrointestinal e a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de vibriónáceas é uma importante propriedade (CHABRILLÓN *et al.*, 2005).

O isolamento e seleção de BAL foram devidos à reconhecida capacidade destas bactérias em colonizar e inibir ou reduzir a incidência de bactérias do tipo *Vibrio sp.* em diversas espécies de peixes marinhos, inclusive de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) (GATESOUPE, 1994; KENNEDY *et al.*, 1998; CARNEVALI *et al.*, 2004; RENGPIPAT *et al.*, 2008).

É reconhecido que as bactérias ácido-láticas não são numericamente dominantes na microbiota gastrointestinal de peixes sob condições normais (RINGO e GATESOUPE, 1998). Porém, GILDBERG *et al.* (1997) mostraram que a colonização de BAL no trato digestório pode ser aumentada, chegando a aproximadamente 70 % da microbiota usando dietas experimentais. Resultados também obtidos neste trabalho, possibilitando colonizações acima de 50 % da microbiota no trato digestório de cada cepa utilizada.

A colonização de BAL no trato gastrointestinal, obtida neste ensaio, foi semelhante entre os tratamentos que foram alimentados com as dietas suplementadas, indiferente da origem bacteriana. A maior colonização de bactérias vibriónáceas no trato gastrointestinal dos peixes no tratamento

controle pode ser atribuída à ausência de BAL e segundo RINGO e BIRKBECK (1999) à tendência de bactérias, Gram-negativas, dos gêneros *Vibrio* em dominar a microbiota de peixes marinhos.

No presente trabalho, o crescimento de bactérias do tipo *Vibrio spp.* foi reduzido por bactérias não patogênicas *Lactococcus spp.* e *Lactobacillus plantarum* no ensaio *in vitro* e *in vivo*. Indicando que ambas as linhagens podem exercer um possível controle antimicrobiano, no estabelecimento de bactérias potencialmente patogênicas, no trato digestório de juvenis de robalo-peva.

Os resultados obtidos no teste de viabilidade da ração permitem a estocagem da ração, após adição do probiótico, por um período de no mínimo 30 dias. Resultado também obtido por GILDBERG *et al.* (1995) e (1997) utilizando BAL. Demonstrando a praticidade do uso de BAL, que segundo FULLER (1989), é enfatizado pela viabilidade destes microorganismos por um período de tempo em condições de estocagem de alimentos.

A utilização de bactérias ácido-láticas como probiótico é uma alternativa na prevenção de problemas gerados pela intensificação da produção de qualquer espécie de organismo aquático. E o isolamento de cepas probióticas a partir dos próprios animais ou do meio em que estão, pode ajudar na solução dos problemas gerados no cultivo intensivo e repovoamento de organismos aquáticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em futuros experimentos com BAL em robalo sugerem-se testes de infecção experimental para verificar a sobrevivência e parâmetros imunológicos, avaliação de atividade enzimática das bactérias selecionadas com possíveis efeitos nutricionais, melhor época de aplicação de acordo com desenvolvimento ontogenético, diferentes vias de aplicação como inoculação em alimento vivo e teste em escala comercial para verificar a viabilidade de utilização em produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, B. and ZHANG, X. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 119–124.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 114: 173–186
- BARTLEY, D.M.; BONDAD-REANTASO, M.G.; SUBASINGHE, R.P. 2006. A risk analysis framework for aquatic animal health management in marine stock enhancement programmes. *Fisheries Research*, 80: 28–36
- BLANKENSHIP, H.L. and LEBER, K.M. 1995. A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium*, 15: 67-175.
- BRENNAN, N.P.; DARCY, M.C.; LEBER, K.M. 2006. Predator-free enclosures improve post-release survival of stocked common snook. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335: 302–311
- CARNEVALI, O.; DE VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, Amsterdam, 258: 430–438.
- CARNEVALLI, O.; ZAMPONI, M.C.; SULPIZIO, R.; ROLLO, A.; NARDI, M.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; CAGGIANO, M.; POLZONETTI, M.; CRESCI, A. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, Amsterdam, 12: 377-386.
- CHABRILLÓN; M., RICO, R.M.; DÍAZ-ROSALES, P.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. 2005. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalense sole, *Sole senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 28, 531-537.

- CHAPMAN, P.; CROSS, F.; FISH, W.; JONES, K. 1982. Final Report sportfish introductions project. Study In: Artificial Culture of snook. Florida: Game and Fresh Water Fish Comission, 35p. (mimeo report).
- DIXON, B.A. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; JASPERS, E.; OLLEVIER, F. In: Larvi'91. Symposium on fish and crustacean. Aquaculture European Society. Special Publication, 15. Ghent, Belgium. p.184. 1991.
- FULLER, R. 1989. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66. 365-378.
- FULLER, R. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics. The Scientific Basis. Chapman and Hall, New York, NY, p. 1-8, 1992.
- GARCIA, A.F. and MASSAM, J.P. 2005. Elimination of antibiotics in hatcheries while improving production levels by use of probiotics. *J. World Aquaculture*, Boca Raton, 36: 57-60.
- GARCIA DE LA BANDA, I.; CHEREGUINI, O.; RASINES, I. 1992. Influencia de La adición de bactéria lácticas em El cultivo larvário del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr., Espanha*, 8: 247-254.
- GATESOUBE, F.J. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture, Amsterdam*, 96: 335-342.
- GATESOUBE, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.), against pathogenic vibrio. *Aquatic Living Resources*, 7: 277-282.
- GATESOUBE, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 180: 147-165.
- GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; BAGWALD, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, Amsterdam, 138: 23-34.
- GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.; RINGO, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, Belgium, 352: 279-285.
- GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. 2000. The use and selection of probiotic bactéria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, Amsterdam, 191: 259-270.
- HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZZA, A.; NIELSEN, J.; MELCHIOSEN, J.; JENSEN, S.; DUNCAN, H.; AHREN, P.; BIRKBECK, H.; GRAM, L. 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. *System. Appl. Microbiol.* 27, 360-371.
- HUYS, L.; DHERT, P.; ROBLES, R.; OLLEVIER, F.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. 2001. Search for beneficial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 193: 25-37.
- KENNEDY, S.B.; TUCKER JR., J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER, V.R.; JARNEL, J.L.; SENNETT, D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. of Marine Science*, 62 (2): 573-578
- KRAXBERGER-BEATTY, T.; MCGAREY, D.J.; GRIER, H.J.; LIM, D.V. 1990. *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*, 13: 557-560.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2004. Crescimento Microbiano. In: Microbiologia de Brock. São Paulo: prentice Hall. p. 127-144.
- MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia*, Belgium, 358: 285-290.
- MUROGA, K.; HIGASHI, M.; KEITOKU, H. 1987. The isolation of intestinal microbiota of farmed Red Seabream (*Pargus major*) and Black Seabream (*Acanthopargus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, Amsterdam, 65: 79-88.
- OLAFSEN, J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 200: 223-247.
- RAMÍREZ, C.; CIFFONI, E.M.G.; PANCHENIAK, E.F.R.; BOLÍVAR, G.A.; SOCCOL, C.R. 2005. Microorganismos lácticos con características probióticas para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibióticos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS, 8 - COLMIC. Colômbia.

- RENGPIPAT, S., RUEANGRUKLIKHIT, T., PIYATIRATITIVORAKUL, S. 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile sea bass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research* 39, 134-143.
- RINGO, E. and BIRKBECK, T.H. 1999. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30: 73-93.
- RINGO, E. and GATESOUBE, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, Amsterdam, 160: 177– 203.
- SUGITA, H.; OKANO, R.; SUZUKI, Y. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries science*, 68: 1004-1011.
- TEMPLE, S.; CERQUEIRA, V.R.; BROWN, J.A. 2003. The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* poey 1860). *Aquaculture*, Amsterdam, 233: 205-217.
- TUCKER Jr, J.W. 1998. Marine Fish Culture. United Kingdom: Blackwell Publisher. p.498.
- TUCKER Jr, J.W. 1987. Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. *The Progressive Fish-Culturist.*, 49: 49-57.
- VASEEHARAN, B. and RAMASAMY, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. por *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 83-87.
- VAZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, Amsterdam, 245: 149– 161.
- VENDRELL, D., BALCÁZAR, J.L., RUIZ-ZARZUELA, I., DE BLAS, I., GIRONÉS, O., MÚZQUIZ, J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29: 177–198.
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 64: 655–671.
- VIEIRA, F.N., PEDROTTI, F.S., BUGLIONE, C.C., MOURIÑO, J.L.P., BELTRAME, E., MARTINS, M.L., RAMIREZ, C., VINATEA, L.A., 2006. Effect of use of acid-lactic probiotic bacterias in the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hatchery survival and microbiology of the water and larvae. *Brazilian Journal of Oceanography*. (in press).
- VINE, N.G., LEUKES, W.D., KAISER, H. 2004a. In vitro growth characteristics of Five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens growth in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.*, 321: 145-152.
- VINE, N.G., LEUKES, W.D., KAISER, H., DAYA, S., BAXTER, J., HECHT, T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27: 319-326.

Influência da aplicação de probiótico no crescimento, sobrevivência, atividade de proteases digestórias e resistência ao estresse em juvenis de robalo peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860

Resumo

O efeito da aplicação de bactéria ácido láctica durante o desmame de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) sobre o crescimento, sobrevivência, atividade proteolítica e resistência ao estresse foram verificados neste ensaio. Indivíduos com 56 dias após a eclosão foram submetidos a três tratamentos sendo um controle, alimentados exclusivamente com meta náuplios de *Artemia* durante todo período experimental, dois tratamentos de desmame (substituição gradual do alimento vivo pela dieta seca) sendo um deles com adição de *Lactobacillus plantarum* na dieta. Após 14 dias de co-alimentação, o experimento continuou por mais 15 dias com fornecimento exclusivo de dieta seca nos tratamentos de desmame. A água foi renovada com um fluxo de 2,5 L /h. e os parâmetros físico-químicos de qualidade de água como temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH e amônia tóxica foram mensurados periodicamente sem diferença estatística entre os tratamentos. O crescimento em peso e comprimento, sobrevivência e atividade de protease digestória ácida não diferiram estatisticamente durante o período experimental, entre os tratamentos. A atividade de protease alcalina e sobrevivência ao teste de estresse diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao final do período experimental. A maior resistência ao teste de estresse, produção de protease com possíveis efeitos nutricionais e consecutivamente fisiológicos, habilidade em inibir patógenos e conseqüentemente promover bem estar, indicam *L. plantarum* como tratamento probiótico em cultivo de robalo, melhorando a qualidade dos peixes tornando próprios ao cultivo, transferências, repovoamentos e como uma válida alternativa para o uso de drogas e antibióticos na piscicultura marinha.

Palavras chave: robalo, *Lactobacillus plantarum*, protease e teste de estresse.

1-Introdução

O robalo-peva *Centropomus parallelus* é uma espécie com distribuição entre áreas tropical e subtropical da costa atlântica das Américas, desde o sudeste dos Estados Unidos até o sul do Brasil. Trata-se de animais catádrocos, eurihalinos, podendo alcançar 5 Kg, com alto valor de mercado, importante em pescarias esportivas e com um grande potencial para o cultivo em tanques de água doce ou salgada, cercados ou raceways. (Rivas, 1986; Tucker, 1987; FAO, 2008).

Cerqueira *et al.* (1995), Alvaréz-Lajonchere *et al.* (2002, 2004), Temple *et al.* (2004) e Alves Jr *et al.* (2006) apresentaram e discutiram aspectos relacionados a larvicultura, desmame e produção massiva de juvenis do robalo-peva (*Centropomus parallelus*) no sul do Brasil.

A maior restrição para a produção em larga escala é a dificuldade em produzir juvenis em quantidade suficiente para o cultivo desta espécie (Tucker, 1998; Temple *et al.*, 2004). As altas mortalidades e baixas taxas de crescimento larval e juvenil durante o período de desmame, por problema nutricional, são alguns dos mais notáveis problemas no desenvolvimento do cultivo

intensivo de peixes marinhos (Planas e Cunha, 1999; Cahu e Zambonino-Infante, 2001; Koven *et al.*, 2001; Santamaria *et al.*, 2004).

Segundo Kolkovski e Tandler (1995), o baixo desempenho das micro-dietas está relacionado à inadequada incorporação de nutrientes devido a uma pobre ingestão, digestão e /ou absorção. Esta limitação em aceitar e assimilar todos nutrientes da dieta seca pode ser explicado pelo desenvolvimento ontogenético, que consiste em uma progressiva diferenciação durante a etapa larval até completar o desenvolvimento dos órgãos e funções na fase juvenil e adulta (Civera - Cerecedo *et al.*, 2004).

Assim, para facilitar o desenvolvimento de dietas adequadas, Lazo (2000) sugere entre outros itens, avaliar dietas que estimulem a secreção de enzimas digestórias e a utilização de probióticos que aumentem a eficiência da digestibilidade.

Entre os ingredientes das dietas, a proteína tem grande importância por ser o maior constituinte orgânico no tecido dos peixes, constituindo aproximadamente 65 - 75% do peso seco. Além disso, a proteína consumida é hidrolisada para obtenção de peptídeos e aminoácidos que serão absorvidos no trato intestinal e distribuídos através da corrente sanguínea para os órgãos e tecidos. Estes irão sintetizar novas proteínas para crescimento, produção de enzimas, metabolismo, neurotransmissores e funcionamento do sistema imunológico (Beisel, 1982; Halver e Hardy 2002).

Os microrganismos encontrados na água, estrutura de cultivo, ar, alimento e animais são de fundamental importância na manutenção da sanidade e estabilidade nos sistemas de produção na aquicultura. Podem também ter efeitos negativos como a transmissão de doenças por bactérias patogênicas. Através dos probióticos pode-se obter resultados positivos, como modificar a comunidade microbiológica competindo por locais de adesão, otimizar o uso da alimentação auxiliando na digestão, acentuar o valor nutricional, estimular o sistema imune do hospedeiro e melhorar a qualidade do efluente (Verschuere *et al.*, 2000, Horowitz e Horowitz, 2002).

Inúmeros estudos têm demonstrado o interesse no uso de bactérias lácticas (BAL) e de seus produtos metabólicos como potenciais probióticos em aquicultura (Gatesoupe, 1994; Ringo e Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999). Efeitos positivos como aumentar sobrevivência, uniformidade de tamanho e taxa de crescimento específico em larvas de robalo flecha (*Centropomus undecimalis*), “spotted seatrout” (*Cynoscion nebulosus*) e tainha (*Mugil cephalus*) (Kennedy *et al.*, 1998), inibir o crescimento de bactérias do tipo *Vibrio* através de compostos inibitórios (Vasquez *et al.*, 2005) e produção de enzimas digestórias, proteolíticas, amilolíticas e celulolíticas (Saha *et al.*, 2006). Villamil *et al.* (2002), Panigrahi *et al.* (2004) e Taoka *et al.* (2006) através da aplicação de BAL obtiveram melhora no sistema imune, tolerância ao estresse e patógenos em “turbot” (*Scophthalmus maximus*), truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) e linguado (*Paralichthys olivaceus*). Varela *et al.* (2007) obtiveram juvenis de pargo (*Sparus aurata*) com melhor crescimento e parâmetros metabólicos, entretanto sem melhora nos parâmetros imunológicos.

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da suplementação de bactéria ácido láctica à dieta como probiótico durante o desmame sobre a sobrevivência, crescimento, atividade de proteases digestórias e resistência ao estresse em juvenis do robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey).

2-Materiais e Métodos

2.1-Local de estudo

Parte deste estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) /CCA /UFSC; os ensaios das atividades enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia Aplicada à Nutrição do Departamento de Bioquímica /CCB /UFSC e os ensaios microbiológicos, no setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos /CCA /UFSC.

2.2-Material biológico e delineamento experimental

Juvenis com idade de 53 dias após a eclosão ($78 \pm 0,18$ mg e $19,96 \pm 1,71$ mm) provenientes de desovas com reprodutores do plantel do LAPMAR foram estocados na densidade de 5 juvenis /L. e mantidos por 3 dias antes do início do experimento. O protocolo de manejo ambiental e a programação da alimentação durante a larvicultura seguiram as técnicas descritas por Alvarez-Lajonchère *et al.* (2004) com modificações, tendo o início do desmame aos 56 dias após eclosão.

Os juvenis foram submetidos a três tratamentos (*Artemia*, dieta e dieta com BAL) com 5 réplicas e mantidos por um período experimental de 30 dias. Foram determinados o crescimento em peso (mg), comprimento total (mm) e atividades de proteases digestórias alcalina e ácida. A análise de sobrevivência foi feita ao final do período experimental e posteriormente realizado o teste de estresse hipersalino.

As unidades experimentais eram compostas por tanques retangulares pretos com volume útil de 30 L.. Estes eram equipados com aeração, aquecedores submersos com temperatura controlada através de termostato, água renovada com um fluxo de 2,5 L. /h. e fotoperíodo de 12 h. mantido com lâmpadas fluorescentes. Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados semanalmente. As sobras de alimento e fezes eram sifonados diariamente após a última alimentação.

2.3-Alimentação

2.3.1- Protocolo alimentar

O controle foi alimentado com aumento gradual (37-50 /mL) de meta-núplios de *Artemia franciscana* (Great Salt Lake- EUA) enriquecidos com DHA Selco® (INVE-Bélgica). Os tratamentos de desmame tinham co-alimentação de meta-núplios de *Artemia* enriquecidos (37 /mL.) e ração comercial micro encapsulada (1-2 g /dia) no primeiro período e posterior fornecimento exclusivo das respectivas dietas (3 g /dia) (Figua 1). As dietas secas (200-400 µm) diferiam entre os tratamentos devido à adição de *Lactobacillus plantarum* à segunda dieta (57,8 % de proteína bruta e 13,2 % de lipídios para dieta e 57,9 % de proteína bruta e 12,7 % de lipídios para dieta suplementada com BAL).

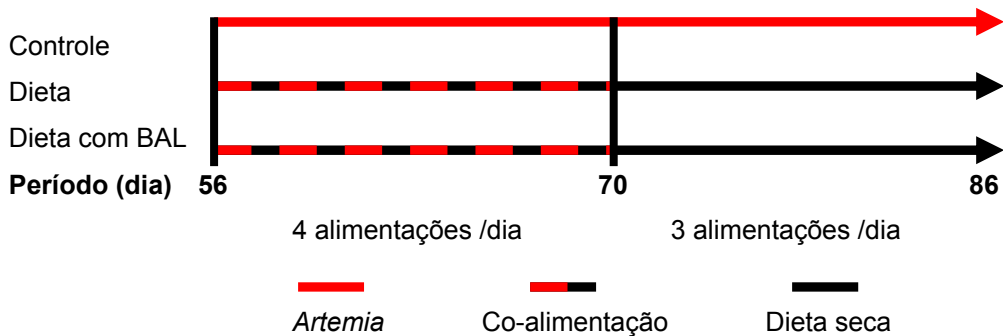
A alimentação foi fornecida manualmente, quatro vezes ao dia (09, 12, 14 e 17 h.), durante o período de co-alimentação e três vezes ao dia (10,14 e 17 h) no período seguinte.

2.3.2-Preparo da dieta

A dieta com BAL foi enriquecida através da aspersão da cultura de *Lactobacillus plantarum* (CPQBA - 007 - 07) na concentração de 1×10^8 UFC /mL., crescida previamente em meio líquido em agitação contínua por “shaker” a 30 °C por 48 h.. A dieta seca do outro tratamento foi aspergida com

o mesmo meio líquido sem adição de bactérias. As dietas foram mantidas em estufa a 30 °C por 48 h. para o crescimento bacteriano e secagem das dietas. Após foram conservadas sob refrigeração a 4 °C durante o período experimental. Foram realizados plaqueamentos em meios sólidos para verificação das colônias viáveis na ração, no início e ao final do experimento.

Figura 1. Protocolo alimentar dos tratamentos durante o experimento.



2.4-Coleta de amostras

Os exemplares amostrados (com 56, 71, e 86 dias) foram sacrificados por choque térmico (resfriamento em mistura de gelo e água), enxugados, pesados e medidos o comprimento total.

Para a avaliação microbiológica os juvenis foram imediatamente processados, enquanto que para a quantificação das atividades enzimáticas, os exemplares amostrados foram armazenados a -20 °C até o momento da determinação.

2.5-Avaliação microbiológica

A confirmação da colonização da BAL, fornecida através da dieta foi realizada no início e ao final do experimento, no trato digestório dos juvenis, segundo adaptações dos métodos de descrito por Muroga *et al.* (1987) e Ramírez *et al.* (2005). A região ventral dos peixes, com a retirada da cabeça, região dorsal e cauda, foi homogeneizada com solução salina estéril (1:1; p/v), submetidas a três diluições sucessivas (1:10) em Agar MRS (Difco) com 2 % de NaCl e azul de anilina (0,5 %) como indicador. As placas foram incubadas por 48 h. a 30 °C em estufa. Foram amostrados 5 juvenis por tratamento no início e ao final do experimento.

Para a viabilidade bacteriana na dieta, esta foi macerada (1:5, p/v) em solução salina estéril, plaqueada e incubada conforme descrito acima.

2.6-Avaliação enzimática

As atividades de enzimas digestórias, protease alcalina e ácida totais, foram quantificadas no sobrenadante do homogenato do sistema digestório de robalos e no sobrenadante da cultura de *L. plantarum*. Para a obtenção dos homogenatos os peixes (5 peixes /tanque) foram dissecados, sobre o gelo, com a retirada da cabeça, região dorsal e cauda. A parte restante, região ventral com trato digestório, foi homogeneizada com água destilada gelada (na proporção de 1:6 (tecido /volume) nas amostras dos dias 56 e 71 e 1:7 (tecido /volume) no dia 86), utilizando um homogeneizador van Potter

por 2,5 min. O homogenato foi centrifugado a 27.167 g por 15 min. a 3 °C, obtendo-se o extrato enzimático do trato digestório, que serviu para a quantificação das atividades proteolíticas e de proteína solúvel. A determinação da concentração de proteína solúvel foi feita através do método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) como padrão. Foi determinada, também, a atividade de protease extracelular bacteriana e de proteína solúvel no sobrenadante, obtido pela centrifugação da cultura bacteriana crescida por 48 h. Esta centrifugação foi feita nas mesmas condições acima descritas.

A atividade de protease alcalina total foi determinada pela hidrólise da Azocaseína (Sigma, St. Louis, Mo USA) pelo método descrito por Garcia Carreño *et al.* (1997) a 25 °C. Para a determinação dos produtos desta atividade, o sistema de incubação, após cessada a reação, foi mantido por 15 min. a 4 °C e centrifugado a 11.000 g por 5 min. A absorbância, a 366 nm, do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (FEMTO, mod. 660). A atividade de protease alcalina total foi expressa em atividade específica da diferença na absorbância entre o teste e um controle, por min., por mL, por mg de proteína no extrato enzimático ou no sobrenadante da cultura bacteriana ($\Delta \text{abs}_{.366 \text{ nm}} / \text{min} / \text{mL} / \text{mg}$ proteína).

A atividade de protease ácida foi determinada através da hidrólise de hemoglobina bovina (Sigma, St. Louis, USA) pelo método descrito por Anson (1938) com pequenas modificações conforme descrito por Vega-Orellana *et al.* (2006). Os produtos da hidrólise ácida, solúveis ao ácido tricloacético (TCA), presentes no sistema de incubação (25 °C) foram determinados pelo reagente Folin (FLUKA Biochemika, Switzerland), a 660 nm, através de uma curva padrão de tirosina (Merck S.A., Darmstadt, Germany). A atividade foi expressa como μmol de tirosina, por min., por mL, por mg de proteína do homogenato ou do sobrenadante da cultura bacteriana (atividade específica).

As atividades proteolíticas extracelulares bacterianas foram realizadas no sobrenadante da cultura bacteriana, seguindo as mesmas metodologias acima descritas.

2.7-Teste de estresse

Foi realizado em alta salinidade, para avaliar a qualidade fisiológica dos juvenis, após o final do período experimental (87 dias), segundo adaptação das metodologias descritas por Dhert *et al.* (1992) e Kjorsvik *et al.* (2003). Em cada tratamento, 30 peixes por tanque (87 dias), em triplicata, foram mantidos nas respectivas unidades experimentais contendo aproximadamente 2,5 L. de água marinha (32 ‰ e 24 °C). Após terem ficado por 24 h. em jejum, os animais foram expostos à salinidade de 75 ‰, adicionando em cada tanque 100 mL. de solução hipersalina (NaCl dissolvido em água marinha). A salinidade foi verificada com refratômetro. A mortalidade foi verificada a cada 10 min. e quantificada após o período de 1 h. Os juvenis foram considerados mortos após a perda da mobilidade, equilíbrio, coloração e resposta de fuga a estímulo (simples toque na cauda).

2.8-Análise estatística

Foi realizada através do software STATISTICA. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett de homogeneidade de variâncias. Após, foi realizada Análise de Variância (ANOVA repeated

measures) com nível de significância a 5 %. As diferenças de médias foram detectadas através do teste de Tukey. Os dados de sobrevivência, crescimento em peso e comprimento foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ antes de serem analisados. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

3- Resultados

Ao final do experimento foi observada colonização de *L. plantarum* no trato digestório dos peixes alimentados com a dieta suplementada com o caldo bacteriano. O outro tratamento de desmame, dieta sem adição de BAL, bem como no controle alimentado com *Artemia* não houve colonização desta bactéria (Tabela 1).

Os tratamentos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) para os parâmetros de comprimento total e percentual de sobrevivência, demonstrados na Tabela 1, e crescimento em peso (Figura 2).

Tabela 1- Resultados de comprimento total final, sobrevivência e colonização de BAL nos juvenis de *C. paralellus* alimentados com *Artemia*, dieta e dieta suplementada com BAL ao final do experimento.

Parâmetros	<i>Artemia</i>	Dieta	Dieta + BAL
Comp. total (mm)	30,08 \pm 1,67 ^a	30,88 \pm 1,67 ^a	30,80 \pm 0,71 ^a
Sobrevivência (%)	94,8 \pm 2,1 ^a	96,0 \pm 3,3 ^a	99,8 \pm 0,2 ^a
Colonização de BAL (UFC /g)	0 ^a	0 ^a	4 x 10 ^{6b}

Valores apresentados como média \pm DP de cinco réplicas. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Comprimento inicial foi de 19,96 \pm 1,71 mm.

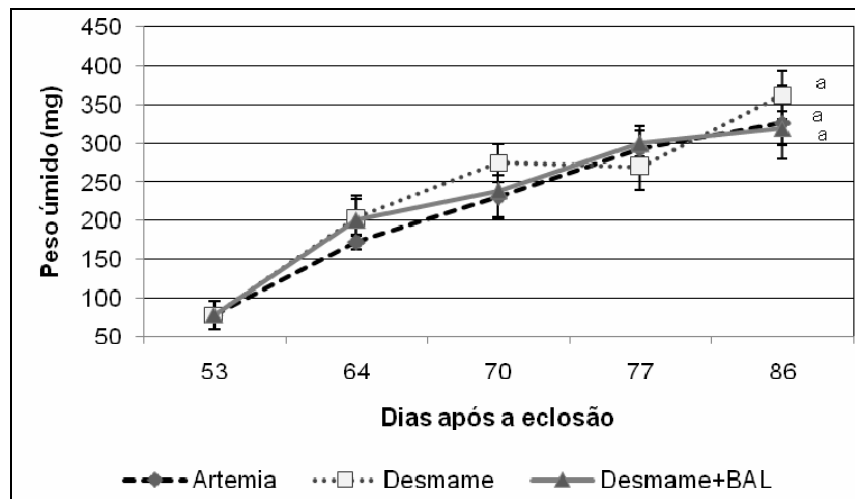


Figura 2. Crescimento em peso úmido dos juvenis de *C. paralellus* alimentados com *Artemia*, dieta e dieta suplementada com BAL ao longo do período experimental. Valores apresentados como média \pm DP de cinco réplicas e com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento suplementado com BAL comparado com os demais ao final do teste de estresse, conforme Figura 3. As primeiras mortalidades no controle e desmame sem BAL aconteceram aos 10 min. de exposição, enquanto que para o tratamento que recebeu BAL na dieta aconteceu somente após 50 min. do teste.

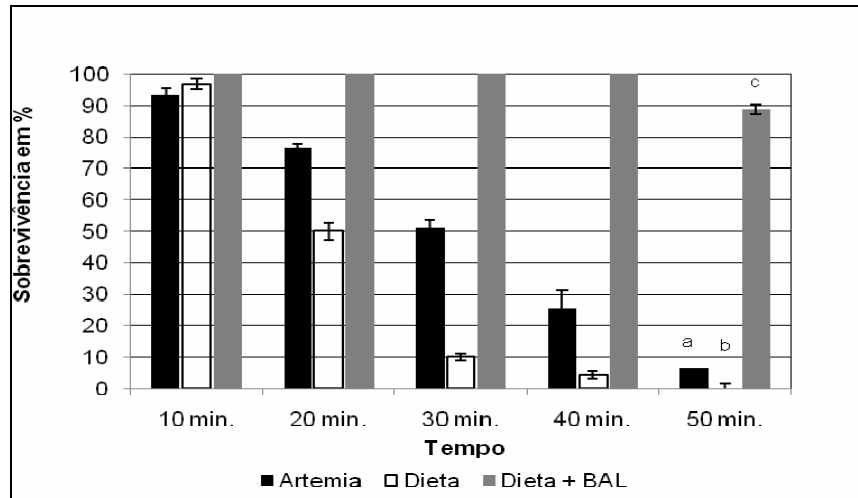


Figura 3. Sobrevivência dos juvenis de robalo - peva alimentados com *Artemia*, dieta e dieta suplementada com BAL submetidos ao teste de estresse hipersalino após período de exposição de 10 a 50 minutos. Valores apresentados como média \pm DP de três réplicas com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As atividades de protease extracelular alcalina e ácida secretadas por *L. plantarum* foram de 1170 mU /mg de proteína e 3,8 U /mg de proteína, respectivamente.

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para atividade proteolítica alcalina no homogenato do trato digestório dos juvenis no último dia de amostragem (Fig. 4). Os juvenis que receberam ração suplementada com BAL apresentaram um aumento de atividade no último dia de amostragem quando comparado aos demais. Diferença que não foi verificada entre os tratamentos para a atividade de protease ácida (Fig. 5) e nos primeiros dias de coleta.

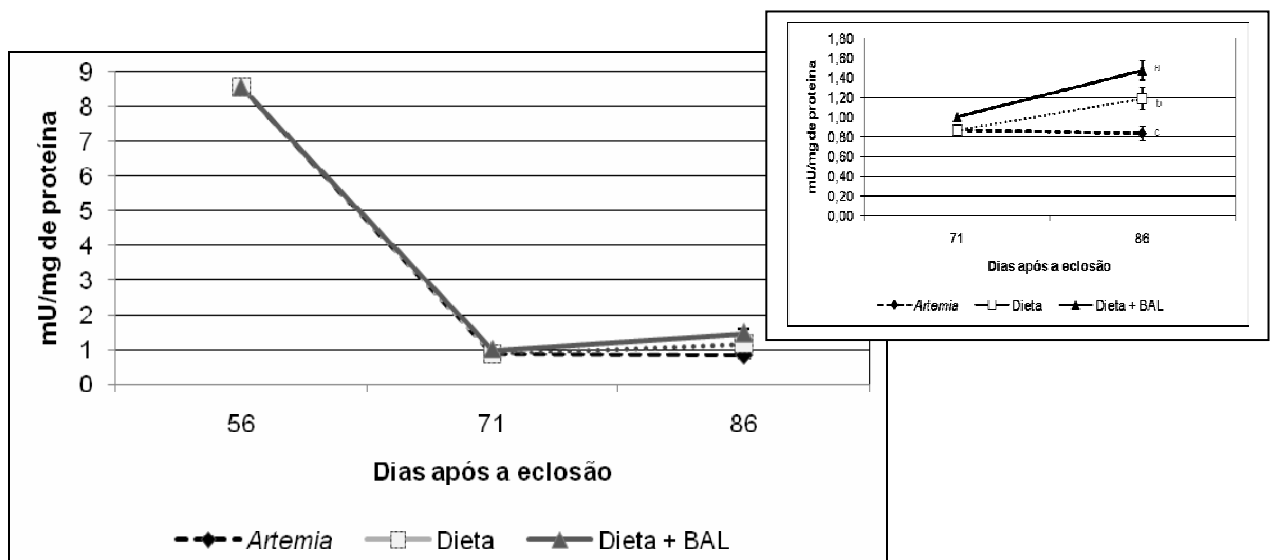


Figura 4. Atividade de protease alcalina no homogenato do trato digestório dos juvenis de robalo – peva alimentados com *Artemia*, dieta e dieta suplementada com BAL durante o período experimental. Dados apresentados como média \pm DP em triplicata de cinco repicas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

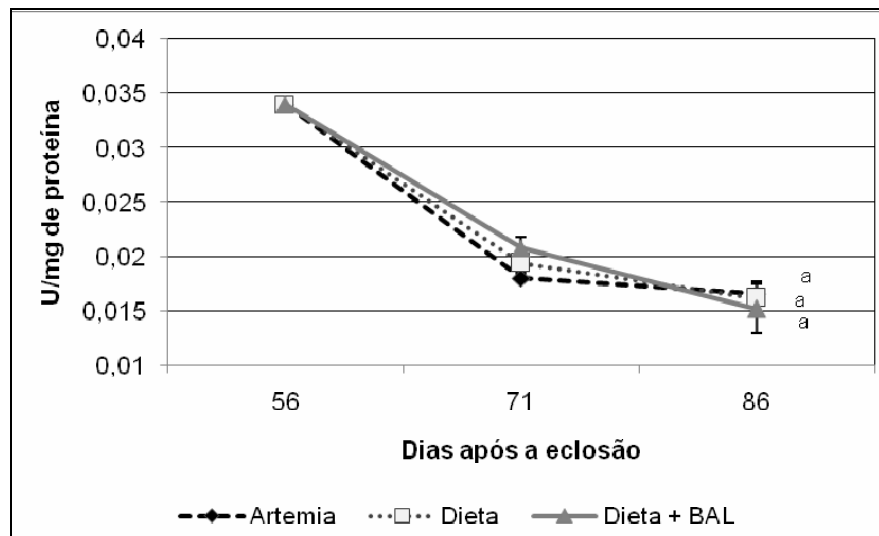


Figura 5. Atividade de protease ácida no homogenato do trato digestório dos juvenis de robalo – peva alimentados com *Artemia*, dieta e dieta suplementada com BAL durante o período experimental. Dados apresentados como média \pm DP em triplicata de cinco réplicas com letras iguais não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Os parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos não apresentaram diferença estatística. A temperatura foi de $24,4 \pm 0,8$ °C, salinidade de 32 ‰ e a intensidade luminosa mantida em 950 LUX. Os valores de pH permaneceram entre 7,6 e 7,9, oxigênio dissolvido foi de 5,3 a 5,7 mg /L e amônia tóxica não foi detectada.

4-Discussão

Neste ensaio foi utilizado BAL devido à capacidade destas bactérias em colonizar o trato digestório, sendo possível manter uma grande população ou colonização através da ingestão regular junto com a alimentação para utilizar na forma de tratamento, que pode ser importante para obter peixes saudáveis e com qualidade (Ringo e Gatesoupe, 1998).

A colonização e manutenção de *L. plantarum* no trato digestório obtidos neste experimento, também foram obtidas em ensaio prévio com juvenis da mesma espécie com conseqüente inibição de bactérias, Gram-negativas, do tipo *Vibrio spp.* (dados não publicados).

Não foi verificado diferença significativa no crescimento em peso, comprimento total e sobrevivência entre o controle e os tratamentos de desmame, indiferente da presença bacteriana. Em experimentos de desmame com *C. parallelus* Honczaryk e Cerqueira (1994) obtiveram resultados similares, entretanto Alves Jr. *et al.* (2005) verificaram maior ganho de peso e taxa de crescimento específico nos tratamentos de desmame quando comparados ao controle. Os resultados para crescimento e sobrevivência adicionando BAL à dieta seca não são conclusivos, Gildeberg *et al.* (1995) e Hidalgo *et al.* (2006) não obtiveram melhores resultados em juvenis de salmão do Atlântico e “dentex” (*Dentex dentex*), Rengpipat *et al.* (2008) mostraram efeito benéfico para crescimento e sobrevivência em juvenis de robalo-asiático (*Lates calcarifer*).

Na aquicultura, dados biométricos são usualmente utilizados para quantificar o sucesso da produção. Entretanto, o crescimento animal é um processo lento, que requer longos períodos para se obter diferenças no tamanho dos peixes, além de não ser garantia de uma ótima condição fisiológica

do peixe. Assim, a aplicação de um teste de estresse, realizado com um pequeno grupo de peixes, serve para testar a capacidade de resistência e pode ser considerado um bom critério para o estágio fisiológico da população de peixes. (Dhert, 1992).

As BAL podem ter efeitos benéficos sobre funções biológicas e sistema imune, que além de conferir resistência a doenças podem ter um positivo efeito na aquicultura, reduzindo os efeitos imunossupressivos do estresse que ocorrem em situações de cultivo (Barton e Iwama, 1991; Thompson *et al.*, 1993; Perdigón *et al.*, 2001). Aplicando probiótico em robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), Carnevali *et al.* (2004) e (2006) obtiveram maior sobrevivência e bem estar, por promover qualidade à microbiota do trato digestório e maior crescimento com juvenis mais saudáveis, auxiliando na competência imune e tolerância ao estresse.

Os resultados obtidos no teste de estresse mostram que a aplicação de *L. plantarum* deixou os peixes mais resistentes, indicando possivelmente uma melhor condição fisiológica e imunológica, bem estar, por promover qualidade à microflora do trato, e peixes mais saudáveis.

Poucos estudos relatam aumento na atividade de enzimas digestórias em peixes através da adição de *Bacillus sp.* à dieta. Em experimento com carpa comum (*Cyprinus carpio*), Wang e Xu (2006) obtiveram melhora na atividade de enzimas digestórias. Entretanto Bairagi *et al.* (2002), Saha *et al.* (2006) e Bhaskar *et al.* (2007) isolaram bactérias do trato digestório de peixes capazes de produzir enzimas digestórias extracelular como proteases, lipases, carbohidrases (amilase e celulase) e fosfatases. Giraud *et al.* (1993) relatam excepcional capacidade de *Lactobacillus plantarum* (cepa A6) em produzir amilase extracelular e conseqüentemente quebrar moléculas de amido levando a uma considerável aquisição destas moléculas.

Neste ensaio a aplicação de *L. plantarum* como probiótico resultou em uma maior atividade de protease alcalina nos juvenis, podendo auxiliar no processo de digestão protéica. Este aumento verificado na atividade enzimática pode ser devido à capacidade desta bactéria em produzir enzimas digestórias extracelular, conforme resultados apresentados, ou devido à melhor condição fisiológica resultante da ação da BAL.

A capacidade de colonizar e conseqüentemente promover bem estar, aumentar a resistência ao teste de estresse, produção de protease com possíveis efeitos nutricionais e consecutivamente fisiológicos, indicam *L. plantarum* como tratamento probiótico em cultivo de robalo, melhorando a qualidade dos peixes deixando-os mais saudáveis, resistentes ao cultivo, transferências e repovoamentos.

5-Referências Bibliográficas

- Alvarez-Lajonchère, L., Cerqueira, V. R., Silva I. D., Araújo, J., Reis, M. 2002. Mass production of juveniles of fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. J. World Aquaculture Society 33 (4), 506–516.
- Alvarez-Lajonchère, L., Cerqueira, V. R., Silva I. D., Araújo, J., Reis, M. 2004. First basis for a sustained juvenile production technology of fat snook *Centropomus parallelus* Poey. Hidrobiológica 14, 37-45.
- Anson, M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. Journal of Gen. Physiology 22, 79 – 85.

- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., Ray, A. K. 2002. Enzyme producing bacterial microbiota isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10, 109-121.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Gironés, O., Múzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 114, 173–186
- Barton, B. A. & Iwama, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1 : 3 – 26.
- Beisel, W. R. 1982. Single nutrients and immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 35. 417-468.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N., Tamil Selvi, A.. 2007. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology*, 98, 2758–2764.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 – 254.
- Cahu, C.; Zambonino-Infante, J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200. 161–180.
- Carnevali, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S.; Cresci, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, Amsterdam, 258: 430–438.
- Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, M., Cresci, A. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, Amsterdam, 12: 377-386.
- Cerqueira, V. R.; Bernardini, M.E. 1995. The weaning of the fat snook *Centropomus parallelus* larvae with experimental and commercial artificial diets. In: LARVI'95- FISH and SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, Ghent, Belgium, 3-7/Set./1995. European Aquaculture Society Special Publication, 24, p. 272-275.
- Civera-Cerecedo, R.; Alvarez-González, C.A.; Moyano-López, F.J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez, L.E.; Rique-Marie, D.; Nieto-López, M.G.; Villareal, D.; Scholz, U.; González, M. Avances in nutrición acuícola, VII. Memórias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México. Noviembre 2004. 93p.
- Dixon, B.A. 1991. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. In: Larvi'91. Symposium on fish and crustacean. Aquaculture European Society. Special Publication, 15. Ghent, Belgium. p.184.
- Dhert, P., Lavens, P., Sorgeloos, P. 1992. A simple test for quality evaluation of cultured fry of marine fish. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. 57/4b, 2135 – 2142.
- Fishbase. Serviço de busca. Disponível em. <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=1014>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2008.
- García – Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A., Ezquerro, J. M. 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. effect of protease inhibition in protein ingredients. *Journal of Marine Biotechnology* 5, 36 – 40.
- Gatesoupe, F.J., Arakawa, T., Watanabe, T. 1989. The Effect of Bacterial Additives on the Production Rate and Dietary Value of Rotifers as Food for Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 83, 39-44.

- Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquat. Living Resour.* 10, 239-246.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probióticos in Aquaculture. *Aquaculture* 180, p. 147-165.
- Gatesoupe, F.J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212, 347– 360.
- Gildberg, A.; Johansen, A.; Bagwald, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, Amsterdam, 138: 23-34.
- Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, L., Raimbault, M. 1993, Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of applied Bacteriology*, 75, 276-282
- Hidalgo, M.C., Skalli, A., Abellan, E., Arizcun, M., Cardenete, G. 2006. Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and proteolytic activities. *Aquaculture nutrition*, 12, p. 256-266.
- Honczaryk, A., Cerqueira, V.R. 1994. Adaptation of the fat snook *Centropomus parallelus* (Poey) Irvae to artificial diets. In: *Proceedings of an International Fish Physiology Symposium*. Vancouver-Canada, American Fish Society. p. 383-388.
- Horowitz, S.; Horowitz, A. 2002. Microbial Intervention in Aquaculture. In: Lee, C.S. and O'Bryen, P. *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems*. World Aquaculture Society, Bato Rouge. p. 119-132.
- Kennedy, S.B.; Tucker Jr., J.W.; Neidig, C.L.; Vermeer, G.K.; Cooper, V.R.; Jarnel, J.L.; Sennett, D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. of Marine Science* 62 (2). 573-578.
- Kjorsvik, E., Hoehne-Reitan, K., Reitan, K.I. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 227, 9-20.
- Kolkovski, S., Tandler, A. 1995 Why microdiets are still inadequate as a viable alternative to live zooplankters for developing marine fish larvae. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. Eds. , *LARVI '95 —Fish and Shellfish Symp. Europ. Aquacult. Soc. Spec. Publ. Belgium*, p. 265–267.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181–201.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, H., Gamsiz, A., Tandler, A. 2001. Advances in development of microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107–121.
- Lazo, J.P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz – Suárez, L.E.; Ricque-Marie, D.; Tapia Salazar, M.; Olvera Novoa, M.A.; Civera Cerecedo, R. *Advances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Nov., 2000. Mexico.
- Olafsen, J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200, 223-247.
- Panigrahi, A., Kirona, V., Kobayashib, T., Puangkaewa, J., Satoha, S., Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 379–388.
- Perdigón, G., Fuller, R., Raya, R. 2001 Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2 (1), 27-42.

- Ramirez, R.F. and Dixon, B.A. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227, 417-426
- Ramírez, C.; Ciffoni, E.M.G.; Pancheniak, E.F.R.; Bolívar, G.A.; Soccol, C.R. 2005. Microorganismos lácticos con características probióticas para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibióticos. VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos – COLMIC, Colombia.
- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., Piyatiratitivorakul, S. 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile sea bass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research* 39, 134-143.
- Ringo, E.; Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177– 203.
- Rivas, L. R. 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia* 3, 579-611.
- Saha, S.; Roy, R.N.; Sem, S.K.; Ray, A .K. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) *Aquac. Research* 37, 380-388.
- Santamaria, C.A.; Marin de Mateo, M.; Traveset, R.; Sala, R.; Grau, A.; Pastor, E.; Sarasquete, C.; Crespo, S. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 237, 207-228.
- Sugita, H.; Okano, R.; Suzuki, Y. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries science* 68, 1004-1011.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.A., 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.
- Temple, S.; Cerqueira, V.R.; Brown, J.A. 2003. The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* poey 1860). *Aquaculture* 233, 205-217.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T. C., Houlinhan, D. F., Secombes, C J. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of Vitamin C. *Aquaculture*, 14 : 1 – 17.
- Tucker Jr, J.W. 1987. Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. *Prog. Fish-Cult.* 49, 49-57.
- Varela, J. L., Jarabo, I. R., Arijó, S., Millán, I. G., del Rio, M. P., Moriñigo, M. A., Mancera, J. M. 2007. Efecto del probiótico Pdp 11 sobre el crecimiento, parámetros metabólicos e inmunológicos de la dorada (*Sparus auratus*). *Vigo*, 25-28
- Vega – Orellana, M. O., Fracalossi, D. M., Sugai, J. K. 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture* 252, 484 – 493.
- Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655-671.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B. 2002. Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *American Society for Microbiology*, 9 (6), 1318–1323.

6-CONCLUSÕES GERAIS

A capacidade de colonizar o trato digestório e inibir o crescimento de bactérias patogênicas do tipo *Vibrio*, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, pode promover o bem estar dos peixes, reduzir mortalidades causadas por bactérias patogênicas e o uso de drogas e antibióticos na piscicultura marinha.

O aumento na resistência ao teste de estresse, produção de protease com possíveis efeitos nutricionais e melhora na condição fisiológica indicam *Lactobacillus plantarum* como tratamento probiótico em cultivo de robalo, melhorando a qualidade dos peixes deixando-os mais saudáveis, resistentes ao cultivo, transferências, manejo, além de reduzir a transferência de patógenos a peixes selvagens.

7-CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em futuros experimentos com BAL em robalo sugere-se um maior período experimental com ensaio de digestibilidade dos nutrientes e acompanhamento do desenvolvimento ontogenético, através de enzimologia e histologia.

Outros testes como infecção experimental, tempo de permanência no trato, melhor época de aplicação de acordo com desenvolvimento ontogenético, diferentes vias de aplicação como inoculação em alimento vivo e teste em escala comercial pode ser útil no desenvolvimento da piscicultura marinha.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CERQUEIRA, V. R.; SILVA I. D.; ARAUJO, J.; REIS, M. Mass production of juveniles of fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 33, n. 4, p. 506 – 516. 2002.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CERQUEIRA, V. R.; SILVA I. D.; ARAUJO, J.; REIS, M. First basis for a sustained juvenile production technology of fat snook *Centropomus parallelus* Poey. *Hidrobiológica*, v.14, n. 1, p. 37-45. 2004.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, v.43, p.119–124. 2006.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, v.200, p.161–180. 2001.
- CERQUEIRA, V. R.; M. E. BERNARDINI. The weaning of the fat snook *Centropomus parallelus* larvae with experimental and commercial artificial diets. In: LARVI'95- FISH and SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, Ghent, Belgium, 3-7/Set./1995. European Aquaculture Society Special Publication, v.24, p. 272-275. 1995.
- CERQUEIRA, V.R. CULTIVO DO ROBALO: Aspectos da Reprodução, Larvicultura e Engorda. UFSC – LAPMAR, 2002, 86p.
- CERQUEIRA, V.R. Cultivo de Peixes Marinhos. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. (Org.) *Aquicultura: Experiências Brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa, 2004, p. 369-406.
- CHAPMAN, P.; CROSS, F.; FISH, W.; JONES, K. Final Report sportfish introductions project. Study In: Artificial Culture of snook. Florida: Game and Fresh Water Fish Commission, 35p. (mimeo report). 1982.
- CHÁVEZ, H. R. Contribución al conocimiento de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus* spp) del Estado de Veracruz, Mexico. *Ciencia*, v.22, p.141-161. 1963.
- CIVERA-CERECEDO, R.; ALVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; MOYANO-LÓPEZ, F.J. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: CRUZ-SUÁREZ, L.E.; RIQUE-MARIE, D.; NIETO-LÓPEZ, M.G.; VILLAREAL, D.; SCHOLZ, U.; GONZÁLEZ, M. Avances in nutrición acuícola, VII. Memórias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México. Noviembre 2004. 93p. 2004.
- DE SCHRIJVER, R.; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, v.186, p.107-116. 2000.
- DIXON, B.A. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; JASPERS, E.; OLLEVIER, F. In: Larvi'91. Symposium on fish and crustacean. Aquaculture European Society. Special Publication, 15. Ghent, Belgium. p.184. 1991.
- FAO. World review of fisheries and aquaculture. The State of World Fisheries and Aquaculture. p.63. 2006.
- GARCIA, A.F.; MASSAM, J.P. Elimination of antibiotics in hatcheries while improving production levels by use of probiotics. *World Aquaculture*, v.36, n.1. p.57-60. 2005.
- GATESOUBE, F.J. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, v. 96, n.3/4. p. 335–342. 1991.
- GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquat. Living Resour*, v.10, p. 239-246. 1994.

- GATESOUBE, F.J. The use of probióticos in Aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p. 147-165. 1999.
- GATESOUBE, F.-J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, v.212, p. 347– 360. 2002.
- HOROWITZ, S.; HOROWITZ, A. Microbial Intervention in Aquaculture. In: CHENG-SHEND LEE AND O'BRYEN, P. Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems. World Aquaculture Society, Bato Rouge. p. 119-132. 2002.
- KENNEDY, S.B.; TUCKER Jr., J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER, V.R.; JARNEL, J.L.; SENNETT, D.G. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Of Marine Science*, v. 62, n. 2. p. 573-578. 1998.
- KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, G.; GERTLER, A. The effect of dietary exogenous digestive enzyme on ingestion assimilation, growth and survival of gilthead seabream *Spaurus aurata*, Sparidae, Linnaeus larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, v.12. p.203-209. 1993.
- KOLKOVSKI, S., TANDLER, A. Why microdiets are still inadequate as a viable alternative to live zooplankters for developing marine fish larvae. In: LAVENS, P., JASPERS, E., ROELANTS, I. LARVI '95 —Fish and Shellfish Symp. Ghent, Belgium, 3-7/Set./1995. European Aquaculture Society Special Publication, v.24, p.272-275. 1995.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, v.200, p.181–201. 2001.
- KOVEN, W., KOLKOVSKI, S., HADAS, H., GAMSIZ, A., TANDLER, A. Advances in development of microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture*, v.194, p.107–121. 2001.
- KRAXBERGER-BEATTY, T.; MCGAREY, D.J.; GRIER, H.J.; LIM, D.V. *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*, v. 13, n. 6, p.557–560. 1990.
- LAZO, J.P. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: CRUZ – SUÁREZ, L.E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA SALAZAR, M.; OLVERA NOVOA, M.A.; CIVERA CERECEDO, R. *Advances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mexico 19-22 Nov., 2000. p. 300-312. 2000.
- MUROGA, K.; HIGASHI, M.; KEITOKU, H. The isolation of intestinal microbiota of farmed Red Seabream (*Pargus major*) and Black Seabream (*Acanthopargus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* v.65, p. 79-88. 1987.
- NATHAN, P.; BRENNAN, M.C.; DARCY, I.; KENNETH, M. Predator-free enclosures improve post-release survival of stocked common snook. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.335, p. 302-311. 2006.
- NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; BYLUND, G.; SALMINEN, S., LILIUS, E.M. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, v.15, p.443–452. 2003.
- OLAFSEN, J.A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, v.200, p.223-247. 2001.
- PLANAS, M.; CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and Perspectives. *Aquaculture*, v.177. p.171–190.1999.
- PLANAS, M.; VÁZQUEZ, J.A.; PÉREZ-LOMBA, R.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, v.240. p.313–329. 2004.

- RAMÍREZ, C.; CIFFONI, E.M.G.; PANCHENIAK, E.F.R.; BOLÍVAR, G.A.; SOCCOL, C.R. Microorganismos lácticos con características probióticas para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibióticos. In: Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos, VIII – COLMIC, Colômbia. 2005.
- RINGO, E.; BIRKBECK, T.H. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, v.30. p. 73-93. 1999.
- RINGO, E.; GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, v.160, p.177– 203. 1998.
- RIVAS, L. R. 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia* 3, 579-611.
- SAHA, S.; ROY, R.N.; SEM, S.K.; RAY, A .K. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) *Aquac. Research*, v.37, p. 380-388. 2006.
- SANTAMARIA, C.A.; MARIN DE MATEO, M.; TRAVESET, R.; SALA, R.; GRAU, A.; PASTOR, E.; SARASQUETE, C.; CRESPO, S. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, v. 237, n. ¼, p. 207-228. 2004.
- SUGITA, H.; OKANO, R.; SUZUKI, Y. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries science*, v. 68. p. 1004-1011. 2002.
- TACON, A.J. Aquaculture production and trends analysis. In: Review of the State of World Aquaculture. FAO Fishery Circular, 886, Rev. 2. FAO, Rome, p. 5–30. 2003.
- TEMPLE, S.; CERQUEIRA, V.R.; BROWN, J.A. The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* poey 1860). *Aquaculture*, v.233, p. 205-217. 2003.
- TUCKER Jr, J.W.; LANDAU, M.P. AND FAULKNER, B.E. Culinary value composition of wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. *Florida scientist*. Fort Pierce, v.48, n.4, p.196-200. 1985.
- TUCKER Jr, J.W. Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. *The Progressive Fish-Culturist.*, v.49, p.49-57. 1987.
- TUCKER Jr, J.W. and JORY, D.E. Marine fish culture in the Caribbean region. *World Aquaculture*, Baton Rouge, v.22, n.1, p. 10-27. 1991.
- TUCKER Jr, J.W. *Marine Fish Culture*. Boston: Kluwer Academic Publishers. p. 750. 1998.
- VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. por *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiótico treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, v.36, p.83-87. 2003.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.4, p.655-671. 2000.
- VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, v.27, p.319–326. 2004.
- VAZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, v.245, p.149– 161. 2005.

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Review: Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol., C.*, v.130, p. 477-478. 2001.

WANG, Y.; XU, Z. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, v.127 , p. 283–292. 2006.