



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM SIMBIÓTICO PARA
O HÍBRIDO DE PINTADO (*Pseudoplatystoma 'êqttwæcpw'*)
E CACHARA (*P. fasciatum*)**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Aquicultura

Orientador: Dr. Maurício Laterça Martins
Co-orientador: Dr. Walter Quadros Seiffert

José Luiz Pedreira Mouriño

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M931s Mouriño, José Luiz Pedreira
Suplementação dietética com simbiótico para o surubim
híbrido de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*P.
fasciatum*) [tese] / José Luiz Pedreira Mouriño ; orientador,
Maurício Laterça Martins. - Florianópolis, SC, 2010.
124 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Aqüicultura.

Inclui referências

1. Aqüicultura. 2. *Pseudoplatystoma*.
3. Bacterioses. 4. *Aeromonas*. 5. Probióticos. I.
Martins, Maurício Laterça. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura. III.
Titulo.

CDU 639.3

**Suplementação dietética com simbiótico para o híbrido de pintado
(*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*P. fasciatum*).**

Por

JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURIÑO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM Aqüicultura

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

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Walter Quadros Seiffert – *Coorientador*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto

Dedico à minha família, Laura minha mãe, José Luiz meu amado pai e meu irmão José Manuel, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos inestimados ensinamentos que formaram meu caráter e construíram minha história.

AGRADECIMENTOS

À empresa Mar e Terra Ltda, por todo suporte técnico e financeiro concedido.

Ao meu amigo, Thiago Tetsuo, líder visionário que acreditou na proposta do trabalho.

Ao meu co-orientador e professor Walter Quadros Seiffert pelo apoio e compreensão durante a execução e conclusão deste trabalho;

Ao meu amigo de luta e vida, e orientador, Mauricio Laterça Martins, sem você não seria possível;

À Família Santiago Pedrotti, que me ajudaram e acolheram em momentos difíceis durante este período.

Aos grandes companheiros de luta feitos no setor de microbiologia do LCM, Felipe, Jatobá, Celso e Bruno;

Ao João Santana, conselheiro de inúmeros problemas e que possui uma visão prática de como deve funcionar a vida;

Aos recentes pupilos e amigos do setor de microbiologia, Gabriel Alves de Jesus, Gabriella Pereira, Mariana Soares, Kati, Nohra Bolivar e Robert dos Santos;

A todos os funcionários e professores do Departamento de Aquicultura pela prestatividade;

Ao Carlito, pela paciência e prestatividade na secretaria da PGAQI;

Ao MPA, FAPESC, CNPq por parte do apoio financeiro concedido para a realização dos estudos;

A todos os companheiros de Polo-aquático da UFSC, que me ajudaram a manter a sanidade nas horas difíceis,

À Scheila Dutra, que com carinho, me manteve com foco e animação para escrever a Tese;

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“a favor de la vida”

RESUMO

O presente trabalho objetivou o isolamento e seleção de bactérias com potencial probiótico para o híbrido resultante do cruzamento entre “pintado”, *Pseudoplatystoma corruscans* e “cachara”, *Pseudoplatystoma fasciatum*, bem como avaliação de diferentes estratégias de aplicação destas bactérias associadas à utilização de prebióticos em dietas comerciais. Na primeira etapa foi isolada e selecionada a cepa *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) como potencial probiótico após ser avaliada *in vitro* na inibição de patógenos bacterianos conhecidos para aquicultura e *in vivo*, colonizando o trato intestinal aumentando o número total de eritrócitos sanguíneos e alterando a microbiologia do trato intestinal. Após esta etapa foi estudada a inclusão de 0,5 % do prebiótico (Inulina) em dieta comercial, a qual não alterou a estabilidade da dieta e proporcionou aumento na concentração bacteriana inoculada. Na avaliação *in vivo*, os animais alimentados com as dietas contendo apenas a bactéria probiótica e dieta suplementada com bactéria probiótica e inulina (dieta simbiótica) apresentaram aumento na concentração de imunoglobulina total sérica quando comparados aos animais suplementados somente com inulina e sem suplementação. Na última etapa do projeto após 24 horas da infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* subsp *hydrophila*, os animais suplementados com *W. cibaria* apresentaram índices de mortalidade inferiores aos dos grupos controle e tratados com a cepa probiótica para tilápias *Lactobacillus plantarum* (7,55±3,78; 31,48±9,32 e 33,06±7,94% respectivamente). Foi observado aumento na atividade de lisozima e proteína sérica total nos peixes suplementados em relação aos não suplementados, porém as concentrações de imunoglobulinas totais dos peixes alimentados com simbiótico *W. cibaria* foram superiores do que as dos peixes suplementados com *L. plantarum* (8,34±0,19 mg.mL⁻¹ e 7,36±0,95 mg.mL⁻¹). Este produto biotecnológico desenvolvido neste trabalho tem como objetivo melhorar a sanidade no cultivo do surubim híbrido, melhorando os índices de sobrevivência e a imunocompetência dos peixes.

Palavras-chave: *Pseudoplatystoma*, bacterioses, *Aeromonas*, prevenção, simbióticos, probiótico.

ABSTRACT

This study aimed to isolate and select of bacteria with probiotic potential for the hybrid as a result of the crossing between “pintado” *Pseudoplatystoma corruscans* and “cachara”, *Pseudoplatystoma fasciatum*, as well as to evaluate different strategies for bacteria administration associated to the use prebiotic in commercial diet. In the first trial *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) was isolated as probiotic-potential bacterium after evaluation *in vitro* of the pathogens inhibition normally known in aquaculture. *In vivo* test showed that this bacterium has colonized the intestine enhancing the total number of erythrocytes and did alter the microbiological features in the intestine tract. After this trial was evaluated the inclusion of 0.5% prebiotic (Inulina) in commercial diet, which did not alter the diet stability and increased the bacterium concentration. When evaluated *in vivo*, animals fed diets containing only probiotic bacterium and those fed diet supplemented with probiotic bacterium and inulin (symbiotic diet) showed an increase in the total immunoglobulin when compared to animals supplemented only with inulin. At the end trial 24 hours after experimental infection with *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*, fish fed *W. cibaria* showed lower mortality rate than that observed in control and those fed tilapia-probiotic *Lactobacillus plantarum* (7.55±3.78; 31.48±9.32 and 33.06±7.94% respectively). Increased lysozyme activity and serum protein in supplemented fish was observed in relation to unsupplemented ones. Nevertheless, total immunoglobulin in fish fed symbiotic *W. cibaria* was higher than the fish supplemented with *L. plantarum* (8.34±0.19 mg.mL⁻¹ and 7.36±0.95 mg.mL⁻¹). This biotechnological product herein developed has the objective to improve the health condition of cultured hybrid surubim, as a result of increased survival rates and fish immune response.

Keywords: *Pseudoplatystoma*, bacteriosis, *Aeromonas*, prevention, symbiotic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Desenho esquemático da definição de probiótico (adaptado de GATESOUBE, 1999). 27
- Figura 2 - Fluxograma referente ao isolamento, caracterização e seleção de bactérias probióticas realizado neste trabalho. 34
- Figura 3 - Metodologia para determinação *in vitro* da inibição do crescimento de cepas patogênicas por cepas de bactérias probióticas. 36
- Figura 4 - Mortalidade acumulada até 96 horas após desafio experimental em híbrido de *Pseudoplatystoma* alimentados com *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) + 0,5% de inulina; com *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+0,5% de inulina e sem suplementação dietética (controle), inoculados com solução tampão estéril (PBS) e *Aeromonas hydrophila*(AHY). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 99

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Diferenças básicas entre micro-organismos probióticos, biorremediadores e biocontroladores..... 29
- Tabela 2 - Atividade antagônica* e morfologia de bactérias ácido lácticas Gram positivas isoladas de intestinos de *Pseudoplatystoma* sp. contra *Aeromonas hydrophila* . *hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM). 57
- Tabela 3 - Atividade antagônica* de bactérias ácido lácticas isoladas de intestinos de *Pseudoplatystoma* sp. contra *Aeromonas hydrophila* . *Hydrophila* (AH), *Aeromonas sobria* (AS), *Vibrio harveyi* (VH), *Vibrio alginolyticus* (VA), *Vibrio anguillarum* (VAN), *Enterococcus durans* (ED), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Escherichia coli* (EC), *Micrococcus luteus* (ML), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Vibrio cholera* (VC)..... 58
- Tabela 4 - Viabilidade de produção na incorporação de diferentes bactérias ácido lácticas em dieta comercial e avaliação de íons de hidrogênio dissociados (pH) em tubos de caldo MRS, a 35°C por 48 h..... 59
- Tabela 5 - Diferentes gêneros de bactérias expressos em concentrações bacterianas baseadas em log de Unidades Formadoras de colônias por Gramo de intestino ($\log(x+1)$ UFC.g⁻¹) de bagres híbridos entre pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), tratado e não com a cepa *Weissella cibaria* (P36) candidata à probiótica, sob diferentes meios de cultura padrão. Letras que diferem entre si, indicam diferença significativa pelo t-teste ($P < 0,05$)..... 60
- Tabela 6- Parâmetros hematológicos de híbridos de bagres híbridos entre pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*P. fasciatum*) alimentados e não alimentados com a cepa *Weissella cibaria* na concentração de 10⁷ UFC.g⁻¹ de ração. Contagens totais de eritrócitos (RBC), de leucócitos (WBC), de trombócitos (TTC), percentual de hematócrito (HTC),

basófilos (BAS), eosinófilos (EOS), leucócito granular PAS positivo (LG-PAS), neutrófilos (NEU), linfócitos (LIM), monócitos (MON) e taxa de glicose (GLC). As letras entre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$)..... 61

Tabela 7- Níveis de garantia da dieta utilizada no estudo, Douramix®-Revolution Alevino..... 74

Tabela 8 - Contagens bacterianas de dietas contendo diferentes concentrações de inulina (Orafti® HPX) inoculadas com *Weissella cibaria*.⁽¹⁾..... 77

Tabela 9 - Contagens bacterianas do trato intestinal de surubins híbridos alimentados com dieta controle e suplementados com 0,5% de inulina, *Weissella cibaria*, e dieta simbiótica (0,5% de inulina na dieta + *Weissella cibaria*)..... 78

Tabela 10 - Parâmetros hematológicos em surubins híbridos alimentados com dieta controle e suplementados com 0,5% de inulina, *Weissella cibaria*, e dieta simbiótica (0,5% de inulina na dieta + *Weissella cibaria*)..... 79

Tabela 11 - Parâmetros imunológicos em surubins alimentados com dieta controle e suplementados com 0,5% de inulina, *Weissella cibaria*, e dieta simbiótica (0,5% de inulina na dieta + *Weissella cibaria*)..... 80

Tabela 12 - Níveis de garantia da dieta experimental utilizada Douramix®-Revolution Alevino..... 93

Tabela 13 - Contagens bacterianas (Log UFC.gr⁻¹) do trato intestinal de surubins alimentados com dieta controle sem suplementação, dieta contendo *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+0,5% de inulina e dieta contendo *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01) + 0,5% de inulina. Médias ± desvio padrão seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 98

Tabela 14- Parâmetros hematológicos de surubins híbridos alimentados com dieta controle sem suplementação, dieta

contendo *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+0,5% de inulina e dieta contendo *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+0,5% de inulina), inoculados com solução tampão (PBS), *Aeromonas hydrophila* (AHY) e sem inoculação (BASAL). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). 102

Tabela 15- Contagem diferencial de leucócitos de surubins híbridos alimentados com dieta controle sem suplementação, dieta contendo *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+0,5% de inulina e dieta contendo *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+0,5% de inulina), inoculados com solução tampão (PBS), *Aeromonas hydrophila* (AHY) e sem inoculação (BASAL). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CGE: célula granulocítica especial..... 103

Tabela 16 - Parâmetros imunológicos em surubins híbridos alimentados com dieta suplementada com *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+com 0,5% de inulina, com *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+com 0,5% de inulina e sem suplementação, inoculados com solução tampão estéril (PBS), *Aeromonas hydrophila* (AHY) e sem inoculação (BASAL). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). . 104

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 25 |
| 2 | DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICO | 26 |
| 3 | PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS | 29 |
| 3.1 | Bactérias Gram Negativas | 30 |
| 3.2 | Bactérias Gram Positivas..... | 31 |
| 3.3 | Outros micro-organismos considerados probióticos..... | 32 |
| 4 | SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS..... | 33 |
| 4.1 | Isolamento de bactérias probióticas..... | 35 |
| 4.2 | Avaliações <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.3 | Avaliações <i>in vivo</i> | 37 |
| 4.4 | Mecanismos de ação..... | 38 |
| 4.4.1 | Competição entre micro-organismos..... | 38 |
| 4.4.2 | Produção de enzimas digestivas | 39 |
| 4.4.3 | Competência imunitária | 39 |
| 5 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 40 |
| 5.1 | PREBIÓTICOS E/OU SIMBIÓTICOS..... | 41 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 42 |
| 7 | JUSTIFICATIVA..... | 43 |
| 8 | OBJETIVOS..... | 44 |
| 8.1 | OBJETIVO GERAL..... | 44 |
| 8.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 44 |
| 9 | FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS | 45 |
| | CAPITULO 2..... | 47 |
| | SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA O SURUBIM HÍBRIDO..... | 47 |
| 10 | RESUMO | 48 |
| 11 | ABSTRACT | 49 |
| 12 | INTRODUÇÃO..... | 50 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 13 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 51 |
| 13.1 | SELEÇÃO DE POTENCIAIS CEPAS PROBIÓTICAS..... | 51 |
| 13.2 | ESTUDO DE VIABILIDADE DE PRODUÇÃO..... | 52 |
| 13.3 | AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> | 53 |
| 13.4 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 53 |
| 13.5 | COLETA DE AMOSTRAS..... | 54 |
| 13.6 | ANÁLISES HEMATOLÓGICAS..... | 54 |
| 13.7 | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO TRATO INTESTINAL..... | 54 |
| 13.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 55 |
| 13.9 | IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR..... | 55 |
| 14 | RESULTADOS..... | 55 |
| 14.1 | SELEÇÃO DE POTENCIAIS CEPAS PROBIÓTICAS..... | 55 |
| 14.2 | ENSAIO DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL..... | 59 |
| 14.3 | HEMATOLOGIA..... | 61 |
| 14.4 | IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR..... | 62 |
| 15 | DISCUSSÃO..... | 62 |
| 16 | CONCLUSÃO..... | 64 |
| 17 | AGRADECIMENTOS..... | 64 |
| 18 | REFERÊNCIAS..... | 65 |
| CAPITULO 3..... | | 69 |
| EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM INULINA E <i>Weissella cibaria</i> SOBRE OS PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS E NÍVEIS DE URUBINS HÍBRIDOS..... | | 69 |
| 19 | RESUMO..... | 70 |
| 20 | ABSTRACT..... | 71 |
| 21 | INTRODUÇÃO..... | 72 |
| 22 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 73 |
| 22.1 | MATERIAL BIOLÓGICO..... | 73 |

| | | |
|------|---|-----------|
| 22.2 | PREPARO DA DIETA | 73 |
| 22.3 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 74 |
| 22.4 | PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS | 75 |
| 22.5 | MICROBIOTA DO TRATO-INTESTINAL | 76 |
| 22.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 76 |
| 23 | RESULTADOS | 77 |
| 24 | DISCUSSÃO | 80 |
| 25 | REFERÊNCIAS | 82 |
| | CAPITULO 4..... | 88 |
| | SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM DIFERENTES SIMBIÓTICOS PARA OS SURUBIM HÍBRIDO DESAFIADO COM <i>Aeromonas hydrophila</i> | 88 |
| 26 | RESUMO | 89 |
| 27 | ABSTRACT | 90 |
| 28 | INTRODUÇÃO..... | 91 |
| 29 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 92 |
| 29.1 | MATERIAL BIOLÓGICO..... | 92 |
| 29.2 | PREPARO DA DIETA EXPERIMENTAL | 92 |
| 29.3 | DESENHO EXPERIMENTAL | 93 |
| 29.4 | PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS | 94 |
| 29.5 | PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS | 95 |
| 29.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 97 |
| 30 | RESULTADOS | 97 |
| 30.1 | PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS | 97 |
| 30.2 | PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS | 99 |
| 31 | DISCUSSÃO..... | 105 |
| 31.1 | PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS | 105 |
| 31.2 | PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS | 106 |
| 32 | CONCLUSÃO..... | 107 |

| | | |
|----|---------------------------------|-----|
| 33 | AGRADECIMENTOS | 108 |
| 34 | REFERÊNCIAS | 108 |
| 35 | CONCLUSÕES GERAIS | 115 |
| 36 | REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO | 117 |

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um ramo do agronegócio mundial que cresce continuamente. O total de pescados continentais ou marinhos tanto provenientes do extrativismo (pesca artesanal e industrial) quanto da aquicultura somaram 143.647.650 toneladas, das quais a aquicultura foi responsável por 51.653.329 toneladas, representando mais de 35% deste total. No Brasil, em 2006, a produção aquícola atingiu a marca de 289.648 toneladas, movimentando um capital próximo a 600 milhões de dólares (FAO, 2008).

Para exemplificar o crescimento da aquicultura pode-se utilizar dados da indústria camaroneira, que entre os anos 2000 e 2004 aumentou sua produção em 32,4%. Porém, esta intensificação associada às más práticas de manejo causou perdas associadas a infecções virais em diversos países como Taiwan, China, Tailândia, Equador e Brasil (WYBAN *et al.*, 1992; GRIMÓN, 2003; LIGHTNER; PANTOJA, 2004; MELO; FARIAS, 2007). Estas perdas também são observadas na piscicultura marinha e continental em diversas espécies de peixes. As doenças podem ter diversas origens, como bacteriana, viral, protozoária e muitas vezes mais de um destes agentes agindo em conjunto, como pode ser observado em PAVANELLI *et al.* (1998) e AUSTIN; AUSTIN, (2007).

Durante surto de enfermidades, diversos agentes químicos podem ser utilizados como tratamentos profiláticos e remediadores às enfermidades, tais como ácido acético, amônia quaternária, cloreto de sódio, formol, iodo, metrifonato, sulfato de cobre, verde malaquita, ácido oxolínico, sulfamerazina, sulfato de magnésio e especialmente os antibióticos, estes últimos diversas vezes são utilizados indiscriminadamente e de maneira errônea.

O uso inadequado destes agentes normalmente ocorre quando não se conhece o agente causador do surto de enfermidade e/ou mortalidade, obrigando produtores a utilizar antibióticos com grande espectro de atuação (Exemplo: tanto para bactérias Gram positivas quanto para negativas, além de alguns protozoários). Esta medida pode provocar a seleção e a resistência dos patógenos (KLAENHAMMER; KULLEN, 1999), além de ser uma fonte de poluição ambiental (BOYD; MASSAUT, 1999) e poder prejudicar a comercialização e saúde humana devido à presença de resíduo nos tecidos dos animais tratados (SAPKOTA *et al.*, 2008). Petersen e Dalsgaard (2003) observaram *in vitro* resistência bacteriana de *Enterococcus* sp. frente à oxitetraciclina e

eritromicina, assim como para *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* (JATOBÁ *et al.*, 2008) em tilápias do Nilo.

Vale ressaltar que, poucos antibióticos têm uso permitido na aquicultura pelos órgãos competentes, como ocorre, por exemplo, nos E.U.A., onde o Centro de Medicina Veterinária autoriza uso somente de oxitetraciclina e eritromicina para toda a aquicultura (MAC MILLAN *et al.*, 2004). Já no Brasil, dentro da aquicultura apenas a tilapicultura e truticultura possuem antibiótico autorizado para ser utilizado nas unidades de produção, o antibiótico florfenicol. Enfatizando esta premissa, a União Européia desde janeiro de 2006, proibiu o uso de antibióticos na produção animal (LIM *et al.*, 2010).

Com este cenário, surge a necessidade de buscar alternativas para o combate às enfermidades. Onde eram praticadas medidas de caráter remediativo, hoje se buscam encontrar ações para o desenvolvimento de práticas preventivas, ou seja, medidas que previnam o surgimento de enfermidades melhorando a saúde animal. Dentre estas medidas os probióticos estão em destaque. Porém o acompanhamento da melhoria nas técnicas de manejo e qualidade da ração tornam o ambiente e os animais mais saudáveis dificultando assim os possíveis surtos de mortalidade e perdas na produção.

Neste capítulo será focado o uso apropriado dos probióticos e como eles podem atuar na aquicultura e contribuir na produção sustentável. Para isto, discutir-se-à a definição adequada do que são probióticos, como pode ser realizada sua seleção e os mecanismos de ação, podendo utilizar ou não outros coadjuvantes como os prebióticos.

2 DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICO

O termo probiótico tem origem de palavras gregas “pro” e “bios”, ou seja, a favor da vida (GISMONDO *et al.*, 1999), sendo estudados há mais de 50 anos e sua primeira definição provém de Lilly e Stillwell (1965), o qual definiu probiótico como “substância produzida por um protozoário que estimula o crescimento de outro”. Esta definição durou 24 anos até Fuller (1989) modificá-la para “micro-organismo vivo utilizado na alimentação que afeta beneficemente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de micro-organismos da flora intestinal”. Esta nova definição deixou de utilizar apenas protozoários abrindo a possibilidade de quaisquer outros micro-organismos serem denominados de probióticos.

Porém, para a aquicultura esta definição pode ser insuficiente, pois em ambientes aquáticos existe constante interação entre os

organismos cultivados e os micro-organismos presentes no ambiente. Sendo assim, Gatesoupe (1999) definiu probiótico para aquicultura como “células microbianas que são adicionadas de maneira que entrem no trato digestivo dos animais, mantendo-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal”. Restringindo os probióticos a micro-organismos que atuam dentro dos animais na sua saúde e não no meio em que eles vivem (Figura 1).

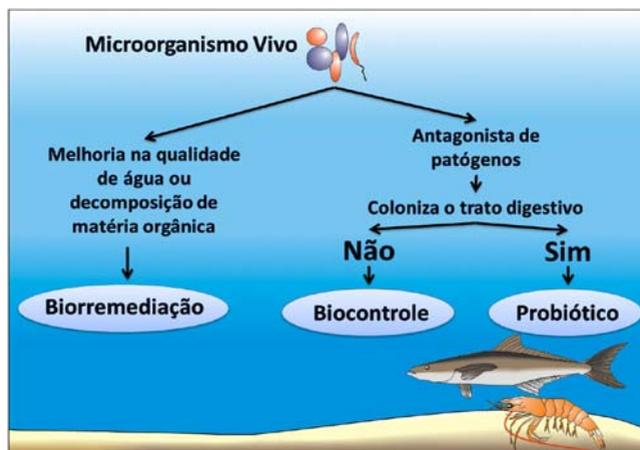


Figura 1 - Desenho esquemático da definição de probiótico (adaptado de GATESOUBE, 1999).

Com o passar dos anos, diversos microrganismos começaram a ser denominados “probióticos”, pois se eles melhoravam de alguma forma o sistema de cultivo, conseqüentemente melhoravam a saúde do animal cultivado. Sendo assim, Verschuere *et al.* (2000a), definiu os probióticos como “micro-organismos vivos que ao serem ministrados a tanques de cultivo atuam beneficemente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, o balanço de bactérias no trato digestivo ou o ambiente de cultivo (viveiro)”. Esta definição não restringe o efeito do probiótico aos animais de cultivo podendo os micro-organismos atuarem apenas no ambiente, seja melhorando a qualidade de água, reduzindo a carga bacteriana da água e/ou a matéria orgânica, além de quaisquer outras formas de atuação.

Nesta definição, os probióticos podem atuar como biorremediadores e biocontroladores. Estes termos já são utilizados na

aquicultura há algum tempo. Os biorremediadores começaram a ser estudados para combater os efluentes produzidos pela aquicultura, seja em laboratórios de reprodução ou fazendas de engorda. Estes rejeitos segundo Sharma e Scheeno (1999) são: restos de alimento e fezes, metabólicos de produtos químicos, excesso de nutrientes presentes na água, resíduos produzidos durante o processo de muda em crustáceos, com risco até de causar possíveis florescimentos algais.

Com a intensificação dos cultivos aumentou também a produção de rejeitos, os ambientes perderam a estabilidade sofrendo modificações que podem debilitar os animais (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Para minimizar estas alterações no meio, a aplicação de macro ou micro-organismos que são utilizados para melhorar a qualidade de água são considerados biorremediadores (MORIARTY, 1998).

O sucesso da biorremediação envolve não somente uma boa taxa de nitrificação para reduzir as concentrações de amônia, boa desnitrificação para retirada do nitrogênio livre na forma de gás, melhora da oxidação do viveiro para evitar acúmulo de hidrogênio livre que pode formar gás sulfídrico, melhora da decomposição da matéria orgânica, além da melhora na mineralização do carbono (ANTONY; PHILIP, 2006). Isto resulta no menor acúmulo de matéria orgânica, melhor penetração do oxigênio no sedimento e geralmente melhora no ambiente de cultivo (RAO; KARUNASGAR, 2000). Esta técnica pode ser útil para sistemas de cultivo fechados onde podemos transformar rejeitos de animais cultivados em biomassa de pescado consumível (BENDER; PHILLIPS, 2004).

Já os micro-organismos bicontroladores possuem a capacidade de reduzir a concentração dos agentes patogênicos no ambiente de cultivo. Entre os micro-organismos utilizados, estão os víbrios (não patogênicos) e microalgas, os quais podem ser ministrados diretamente nos tanques de cultivos ou em alguma forma de alimento vivo, reduzindo a carga de bactérias patogênicas presente na água e no biofilme (MAKRIDIS *et al.*, 2006; KARUNASAGAR *et al.*, 2007).

Segundo Gatesoupe (1999), micro-organismos que não atuam diretamente nos organismos cultivados, apenas melhorando a qualidade do ambiente de cultivo (biorremediadores ou bioaumentadores) e diminuindo a carga de bactérias patogênicas na água (biocontroladores) não são considerados probióticos. Porém alguns poucos micro-organismos são capazes de ser adicionados de diferentes maneiras aos tanques de cultivo e mesmo assim atuar diretamente nos animais.

Sendo assim, fica proposta aqui uma definição que descreve os probióticos para aquicultura de uma forma direta e ampla, definindo-o

como micro-organismos vivos que adicionados ao cultivo de maneira que entrem no trato digestivo dos animais e mantendo-se vivos, atuem beneficemente no animal de interesse, seja melhorando a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas no trato digestivo.

Na Tabela 1, observam-se as diferenças básicas entre micro-organismos probióticos, biocontroladores e biorremediadores, destacando os locais de atuação, os efeitos esperados, além dos efeitos indiretos.

Tabela 1- Diferenças básicas entre micro-organismos probióticos, biorremediadores e biocontroladores.

| Modos de atuação | Local de Atuação | Efeitos diretos | Efeitos Indiretos |
|------------------|--|---|---|
| Probiótico | Animais | Alteração da microbiota intestinal, aumento da competência imunitária | Melhoria na qualidade de água, eficiência alimentar e índices zootécnicos |
| Biorremediação | Ambiente de cultivo (parâmetros físico-químicos) | Redução de amônia, nitrito, nitrato, aumento da capacidade de oxidação da matéria orgânica presente | Melhoria do ambiente de cultivo |
| Biocontrole | Ambiente de cultivo (micro-organismos presentes) | Redução de micro-organismos com potencial patogênico na água e no biofilme | Melhoria do ambiente de cultivo |

3 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Diversos micro-organismos são utilizados como probióticos na aquicultura. Para fins didáticos serão divididos em quatro grandes grupos: bactérias Gram negativas e Gram positivas e outros micro-organismos tidos como probióticos como as leveduras e microalgas. Além disto, vale lembrar que existe a possibilidade de se utilizar um combinado de micro-organismos, sendo mais utilizado entre diferentes tipos de bactérias não antagônicas entre si.

3.1 Bactérias Gram Negativas

Um grande número de bactérias Gram negativas já foi utilizado como probióticas: *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* entre outros. (vide revisão de IRIANTO; AUSTIN, 2002).

No Equador foram isoladas diversas cepas de vibrios diretamente de ambientes marinhos, com objetivo de controlar as mortalidades em larviculturas de *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Uma das cepas isoladas, *V. alginolyticus*, passou a ser utilizada pela indústria camaroneira do país. Após esta medida houve redução nas mortalidades nas larviculturas, assim como redução em mais de 90% na utilização de antibióticos, e conseqüentemente incremento na produção de 35% nas larviculturas do Equador. (GRIFFITH, 1995; IRIANTO; AUSTIN, 2002).

Apesar do sucesso no Equador na aquicultura, as bactérias, em especial as do gênero *Vibrio*, são conhecidas por serem patógenos oportunistas causando mortalidade em camarões em condições de estresse (LIU e CHEN, 2004). *Vibrio harveyi*, responsável pelo aparecimento da “síndrome de gaivota” no Equador, causou perda de 15% na produção. A doença causada por esta bactéria também é conhecida como “síndrome de las *bolitas*” (ROBERTSON *et al.*, 1998) ou “síndrome de Protozooa” (AUSTIN; AUSTIN, 2007). Além dos vibrios diversas outras bactérias Gram negativas são consideradas patogênicas como a bactéria filamentososa, *Flexibacter maritimus*, que registrou perdas de 60% em misis 3 e pós-larva 1 de *L. vannamei* em larviculturas no estado de Santa Catarina (MOURIÑO *et al.* 2008), assim como diversas cepas do gênero *Pseudomonas* e *Aeromonas* (AUSTIN; AUSTIN, 2007).

Outro fator que deve ser ressaltado é a coordenação da expressão de certos genes de virulência que algumas espécies de *Vibrios*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* utilizam para estimular a produção de toxinas patogênicas. O aumento da expressão destes genes ocorre por meio de um mecanismo chamado “*quorum sensing*”, o qual consiste num processo presente em diversas bactérias Gram negativas, de resposta à densidade de população detectando pequenas moléculas sinais, sendo a AHL (Acyl homoserine lactone) a principal destas (MILLER; BASSLER, 2001). Sendo assim, utilizando bactérias probióticas Gram negativas, como os vibriões não patogênicos, pode-se estimular a virulência de outras cepas de vibrios e/ou outras bactérias

Gram negativas patogênicas já presentes nos ambientes de cultivos, tornando seu uso questionável.

3.2 Bactérias Gram Positivas

Quando se fala em micro-organismos probióticos, sem dúvida as bactérias Gram positivas possuem o maior número de representantes, entre eles os gêneros: *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, (vide revisões de RINGO , GATESOUBE, 1998; IRIANTO; AUSTIN, 2002 e BALCÁZAR et al., 2006). Contudo, elas não são dominantes na microbiota intestinal de organismos aquáticos e muitas tentativas têm sido realizadas no intuito de induzir uma dominância artificial destas bactérias (GATESOUBE, 1999).

Entre os gêneros acima mencionados, dois grupos estão em destaque, os *Bacillus* e as bactérias ácido-láticas. Lin *et al.*, (2004) utilizaram *Bacillus* sp. na dieta de camarão (*Litopenaeus vannamei*) melhorando os índices de digestibilidade da ração, e Ziaei-Nejad *et al.* (2006) observaram aumento da atividade das enzimas digestivas em *Fenneropenaeus indicus* Edwards, 1837 tratados com *Bacillus* sp. Além dos camarões, já foram utilizados em peixes e rotíferos com sucesso (QUEIROZ , BOYD, 1998; HIRATA *et al.*, 1998; DECAMP; MORIARTY, 2006). HONG *et al.*, (2005) destaca o gênero *Bacillus* por sua capacidade de esporular, o que acaba facilitando a inclusão em dietas comerciais durante e/ou após extrusão para comercialização dos produtos.

Além disso, *Bacillus* spp. têm capacidade de reduzir a quantidade de patógenos presentes na água de cultivo (através de toxinas e antibióticos), assim como diminuir as concentrações de nutrientes na água, melhorando o ambiente de cultivo como um todo. Porém, vale ressaltar que estas qualidades estão relacionadas com melhoria e combate a patógenos na coluna d'água, enquadrando-as dentro do significado descrito como biorremediadores e/ou biocontroladores, o que não os impede de exercer uma função probiótica indireta.

Entre as bactérias Gram positivas, também há o interesse no uso das bactérias ácido-láticas como probióticos por sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas pela produção de compostos antibacterianos (FULLER, 1989) e sua ação imunestimulante (VIEIRA *et al.*, 2008).

Estas bactérias são caracterizadas por serem anaeróbicas ou aerotolerantes, imóveis, não esporuladas, catalase negativas, com carência de citocromos e produzem ácido láctico como maior produto final do seu metabolismo (RINGO; GATESOUBE, 1998). Além do ácido-láctico, os compostos produzidos que destacam-se são: ácido acético, peróxido de hidrogênio, reuterina e bacteriocinas (VÁSZQUEZ et al., 2005).

Os *Lactobacillus* sp. têm seu efeito probiótico registrado em robalos (*Centropomus* spp.), tilápias (*Oreochromis* spp.) e camarões devido a sua capacidade de colonizar o trato digestivo, alterando a dominância natural da microbiota intestinal e promovendo melhora no sistema imune dos animais (CARNEVALI et al., 2006; JATOBÁ et al., 2008; VIEIRA et al., 2007; 2008). Estes resultados podem estar relacionados com a alta especificidade entre o micro-organismo probiótico e o hospedeiro, pois todos os *Lactobacillus* utilizados nestes trabalhos foram isolados dos animais em estudo, ou seja, as bactérias probióticas utilizadas em tilápias foram isoladas do trato digestivo da mesma, assim como ocorreu para camarões e robalos.

Os efeitos benéficos associados a este grupo de bactéria também incluem desde o aumento de crescimento e eficiência alimentar, até a prevenção de desordens intestinais e pré-digestão de fatores anti-nutricionais presentes em ingredientes na dieta. Atualmente, o foco dado a este gênero de probiótico é o aumento de resistência a patógenos como o *Vibrio* spp. e alterações da microbiota intestinal (VILLAMIL et al., 2003; PLANAS et al., 2006).

3.3 Outros micro-organismos considerados probióticos

As leveduras são micro-organismos que podem contribuir mais especificamente com efeitos de imunoestimulação (SAKAI, 1999; LARA-FLORES et al., 2003; ORTUÑO et al., 2002; ABDEL-TAWWAB et al., 2008) assim como os β -glucanos, não sendo incluídos e classificados como probióticos. Os efeitos imunoestimuladores referenciados pelos trabalhos acima citados bem como o trabalho de Reyes-Berrecil, et al. (2008), trabalhando com a levedura *Debaryomyces hansenii* nas dietas fornecidas à *Sparus aurata* comprova a imunomodulação dos sistema imune inato e da expressão de genes de defesa dos animais mesmo quando estes animais não estão sob a presença de alguma enfermidade concreta. O efeito probiótico da utilização de leveduras pode ser questionável, pois estes micro-

organismos, provavelmente não se mantêm vivos no trato digestivo dos animais.

Alguns autores (AVENDÃNO; RIQUELME, 1999; GOMES-GIL et. al, 2002; MARQUES et. al., 2006) utilizaram misturas de microalgas e bactérias com o intuito de melhorar as culturas de algas a serem oferecidas a outros organismos. Porém, deve-se ter atenção especial a culturas conjuntas de algas e bactérias, pois para um bom resultado seria necessário achar uma espécie de microalga e de bactéria com taxas de crescimento semelhantes, além de não competirem por nutrientes e serem antagônicas.

Makridis *et al.* (2006) observaram que a incubação de artêmia enriquecida com *Tetraselmis chuii* ou *Chlorella minutissima*, durante 30 minutos, diminuiu significativamente a carga de bactérias marinhas totais e de *Vibrio* spp. nas artêmias vivas e congeladas, que é conhecido um vetor de bactérias, principalmente para os vibriões, nas larviculturas de peixes e camarões.

4 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Não existe consenso sobre qual micro-organismo utilizar como probiótico na aquicultura. Nesta escolha, devem-se priorizar micro-organismos isolados da própria espécie que se pretende trabalhar, e utilizando a definição proposta de probiótico: “micro-organismos vivos, que adicionados de maneira que entrem no trato digestivo dos animais mantendo-se vivos, atuem benéficamente no animal de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas no trato digestivo”; sugere-se um protocolo utilizado por VERSCHUERE *et al.* (2000a), para seleção de bactérias probióticas. Pode-se dividir e simplificar a seleção com 3 etapas básicas: isolamento, testes *in vitro* e testes *in vivo* (Figura 2)

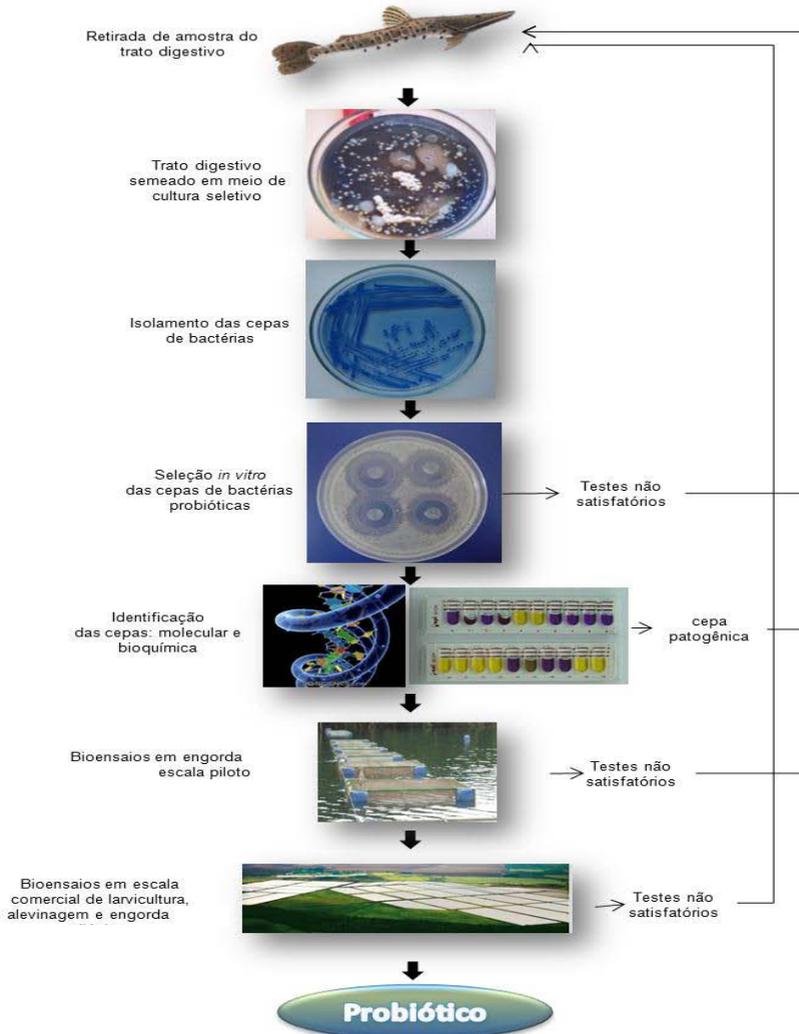


Figura 2 - Fluxograma referente ao isolamento, caracterização e seleção de bactérias probióticas realizado neste trabalho.

4.1 Isolamento de bactérias probióticas

Para isolar micro-organismos com potencial probiótico o primeiro passo é determinar o gênero de bactérias que se pretende trabalhar. Devem-se utilizar meios seletivos como: meio de cultura Agar TCBS (do inglês, “*Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose*”) para o isolamento de *Vibrios*, Agar Cetrimide para *Pseudomonas*, Agar MRS (DE MAN *et al.*, 1960) para bactérias ácido-láticas, entre outros. Para isto, deve-se levar em conta o conhecimento sobre o gênero escolhido, assim como a estrutura disponível de cada laboratório.

Após definição do gênero e seu respectivo meio seletivo, é primordial trabalhar com animais saudáveis, além de isolar micro-organismos da(s) espécie(s) em estudo. Ou seja, para desenvolver um probiótico para tilápias é aconselhável isolar bactérias do trato digestivo de tilápias. Isto é justificado por aumentar a probabilidade das bactérias isoladas colonizarem o trato digestivo dos animais, além de garantir uma especificidade entre micro-organismo e hospedeiro.

Carnevali *et al.* (2006), Jatobá *et al.* (2008) e Vieira *et al.* (2007; 2008) obtiveram bons resultados trabalhando com *Lactobacillus* sp. isolados dos animais em estudo: robalo, tilápia e camarão, respectivamente, onde o efeito da colonização do trato intestinal foi eficiente. Vale salientar, novamente, que a seleção destes micro-organismos deve ser priorizada em animais sadios para facilitar a escolha de micro-organismos não patogênicos e que já poderiam estar atuando de alguma forma no hospedeiro.

Outro motivo para priorizar o isolamento de bactérias dos animais em estudo, é a previa exclusão de micro-organismos isolados do meio (água e solo) que possa não se adaptar a vida no interior do hospedeiro, dificultando atuarem como probióticos por não se estabilizarem no trato digestivo nem interagirem com o sistema imune. Além disso, devem-ser selecionados micro-organismos que cresçam em temperaturas semelhantes as do ambiente de cultivo. Por exemplo, selecionar uma bactéria com temperatura de incubação a 35°C para trabalhar com trutas, pode ocasionar uma menor eficiência da bactéria selecionada no ambiente de cultivo do peixe, prejudicando assim o efeito probiótico desta nos hospedeiros.

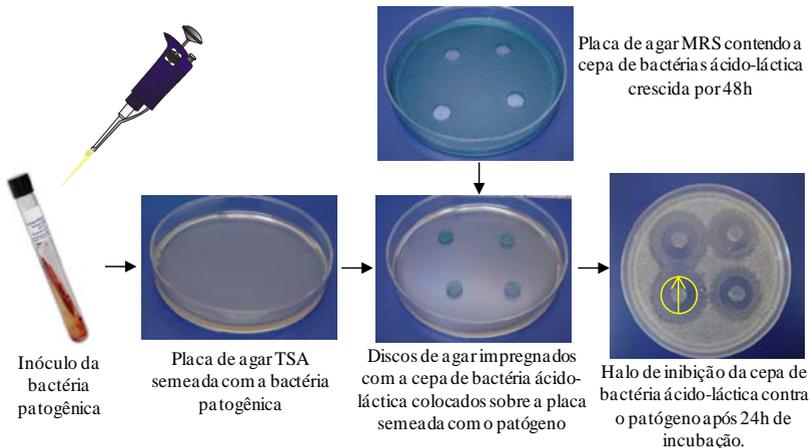
4.2 Avaliações *in vitro*

Depois de isoladas, as cepas devem passar por um processo seletivo *in vitro*, o qual é realizado para se conhecer a bactéria em

questão e demonstrar como as bactérias probióticas poderão atuar nos organismos.

Entre estes testes estão: tolerância a cloreto de sódio para garantir a aplicação em animais que habitem ambientes marinhos e estuarinos, resistência a sais biliares para garantir melhor passagem da bactéria pelo trato intestinal (RAMIREZ, 2005), curva de crescimento ideal em diferentes pHs e temperaturas dos meios de cultura (VIJAYAN *et al.*, 2006), para otimizar sua produção e capacidade da cepa de produzir compostos inibitórios (VINE *et al.*, 2004; RAMIREZ, *et al.* 2006), competição por espaço e/ou nutrientes, inibição *in vitro* de patógenos (Figura 3), assim como produção de enzimas digestivas que possibilitem a melhoria da digestibilidade de dietas comerciais.

Figura 3 - Metodologia para determinação *in vitro* da inibição do crescimento de cepas patogênicas por cepas de bactérias probióticas.



Outros testes podem ser realizados, entre eles a viabilidade da bactéria probiótica na ração, que normalmente é pouco discutido. Em diversos trabalhos, os efeitos dos probióticos são extremamente positivos. Entretanto sua aplicabilidade em escala comercial é inviável, deixando a pesquisa sempre em nível acadêmico e dificultando o fomento ao setor produtivo. A viabilidade do probiótico na dieta está relacionada com a concentração (número de unidades formadoras de colônia por Grama de ração) na dieta, assim como o tempo que estas bactérias se mantêm viáveis na mesma.

Contudo, os testes de seleção *in vitro* não garantem que as cepas selecionadas podem ser denominadas probióticas. ALAVANDI *et al.*,

(2004) relataram que o uso das bactérias candidatas a probiótico como *Pseudomonas* sp. PM11 e *Vibrio fluviales* PM17, selecionadas *in vitro* pela capacidade de inibir patógenos, baixaram os índices imunitários de *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. Isto justifica a necessidade de testes “*in vivo*” para denominar uma cepa de probiótica, haja vista que muitos patógenos são extremamente competitivos, como os vibriões.

4.3 Avaliações *in vivo*

Das cepas que apresentarem potencial probiótico nas avaliações *in vitro*, são realizados os testes *in vivo*, onde se destacarão o ensaio de colonização, sendo uma maneira eficiente de confirmar a presença do micro-organismo no trato digestivo, assim cumprindo uma exigência de Gatesoupe (1999), sugerindo que micro-organismos probióticos devem manter-se vivos dentro do hospedeiro. Todos os organismos vivos estão em equilíbrio na microbiota e os probióticos têm a capacidade de alterá-lo. Porém, para realizar estas alterações são necessárias altas concentrações de probióticos na dieta e/ou no ambiente (BALCÁZAR *et al.*, 2006). Estas alterações podem ser desfeitas, pois a população de micro-organismos probióticos decresce alguns dias após interromper seu fornecimento (FULLER, 1992) ou com aplicação de antibióticos. O decréscimo na população de bactérias ácido-láticas foi observado por Vieira *et al.* (2008) em camarões marinhos alimentados com dieta suplementada com probiótico (*Lactobacillus plantarum*), cuja ação no trato gastrointestinal e efeito imunestimulante foi considerado curto, apenas seis dias.

Diversos fatores podem interferir na colonização dos probióticos, relacionados com o hospedeiro (temperatura do corpo, potencial redox, enzimas digestivas, alimento e resistência genética), com o micro-organismo (capacidade de adesão, alterações de pH, baixa competitividade com micro-organismos presentes, sensibilidade a compostos inibitórios presentes no trato-intestinal, entre outros, assim como a interação micro-organismo hospedeiro.

Com o resultado positivo no ensaio de colonização, devem-se avaliar quais os possíveis benefícios que este micro-organismo pode estimular no animal, para assim poder defini-lo como probiótico, tais como: (1) resistência frente a infecções experimentais com patógenos (GULLIAN *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2007; JATOBÁ *et al.*, 2008) que permite verificar alterações imunológicas e hematológicas estimuladas pelo probiótico em peixes: imunoglobulina total, lisozima, atividade antimicrobiana do soro, título de aglutinação, taxa de

fagocitose, *burst* respiratório, contagem diferencial e total das células sanguíneas, hematócrito, glicose; e em camarões: atividade da enzima fenoloxidase, contagem total e diferencial de hemócitos, atividade antimicrobiana e hemoaglutinante do soro, taxa de fagocitose, lisozima, *burst* respiratório; (2) melhoria nos índices zootécnicos (VENKAT *et al.*, 2004; JATOBÁ, 2008), por meio do crescimento, eficiência alimentar, fator de condição, sobrevivência e produtividade e (3) digestibilidade. Também é essencial verificar se a cepa testada não é patogênica para o hospedeiro (VIJAYAN *et al.*, 2006).

4.4 Mecanismos de ação

Diversos mecanismos de ação podem ser utilizados pelos probióticos dependendo do micro-organismo utilizado, compostos produzidos pelo micro-organismo, assim como a interação probiótico-hospedeiro. Entretanto, é difícil avaliar quais mecanismos são utilizados, devido às limitações tecnológicas utilizadas nas pesquisas com animais, restringindo os mecanismos de ação a suposições. Entre eles estão competição (exclusão e/ou nutrientes), produção de enzimas digestivas e melhora do sistema imunológico.

4.4.1 Competição entre micro-organismos

A competição entre os micro-organismos pode ser por exclusão e competição, de nutrientes e espaço (sítio de adesão na parede do trato digestivo). Entretanto, no interior do trato digestivo dos animais há equilíbrio entre os micro-organismos presentes, sejam eles benéficos ou potencialmente patogênicos. Isto ocorre devido à habilidade dos patógenos bacterianos se aderirem a epitélios como pele, brânquias e trato intestinal (BRUNO, 1988). É necessária a utilização de probióticos que possuam período de residência longo no trato intestinal para potencializar seus efeitos antagonísticos no local de infecção. Este mecanismo de ação é de extrema importância na escolha do probiótico utilizado, pois serve como primeira barreira de defesa contra a invasão do hospedeiro (BALCÁZAR *et al.*, 2006).

Outro modo de competição é a restrição de compostos químicos que as bactérias patogênicas possam necessitar durante a infecção. Em alguns experimentos já descritos por VERSCHUERER *et al.* (2000b), algumas cepas bacterianas, isoladas de cultivos de artemia, colonizaram o trato intestinal de artemia, protegendo-os contra infecções por *Vibrio proteolyticus*. Baseados em estudos com estas cepas probióticas *in vitro*, foi possível observar que não houve produção de substâncias

extracelulares na inibição dos vibrios e sim na competição por compostos químicos e energia presentes disponíveis para estas bactérias no trato intestinal de Artemia.

4.4.2 Produção de enzimas digestivas

Atualmente, sabe-se que a microbiota intestinal influencia diretamente a nutrição dos animais e sua alteração pode ser efetuada tanto pela utilização de diferentes ingredientes na dieta bem como a utilização de bactérias benéficas. Dentre os efeitos benéficos esperados estão o aumento de ganho de peso e/ou o aumento de digestibilidade das dietas utilizadas (BURR *et al.*, 2005). Em estudos efetuados por Wache *et al.* (2006); foi possível observar que a adição de leveduras para larvas de trutas (*Onchorhynchus mykiss*) aumentou os níveis de enzimas digestivas no intestino. Porém, críticas a alguns estudos como estes são efetuados devido ao fato de haver interferência de fatores nutricionais da adição da biomassa de micro-organismos e não do seu efeito adicional na produção das enzimas. Novos estudos são necessários nesta área de probióticos com relação à nutrição, nos quais deve ser enfatizada a comparação da adição de micro-organismos inativados e ativos, para se afirmar o incremento de enzimas digestivas pelos organismos viáveis e não somente por sua biomassa adicionada à dieta.

4.4.3 Competência imunitária

Existem diversos trabalhos relatando o efeito dos probióticos em relação ao sistema imunológico de peixes. De acordo com Panigrahi *et al.* (2004) a utilização de cepas probióticas propiciam imuno-modulação tanto molecular como celular nos animais tratados e cepas como a de *Lactobacillus* sp. e *Bacillus* sp. possuem a capacidade de influenciar as respostas imunológicas tanto em níveis locais bem como em níveis sistêmicos. As respostas celulares não específicas como a fagocitose, foram aumentadas em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792, bem como a atividade da lisozima (resposta humoral). Outros autores como Jatobá *et al.* (2008) descreveram o aumento no número total de eritrócitos, trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos, em peixes alimentados com *L. plantarum* e submetidos à desafio com *Enterococcus durans*.

A utilização de probióticos contra possíveis patógenos está relacionada com auxílio que estas bactérias podem fornecer à microbiota do trato intestinal, protegendo uma das principais portas de entrada para patógenos, a mucosa intestinal. Como os probióticos podem modificar

esta microbiota por diversas formas, auxiliam também a imunomodulação do sistema de defesa dos animais. Trabalhos como os de Nikoskelainen *et al.* (2003), Kim; Austin (2006a); Balcázar *et al.* (2007a,b) e Jatoba, *et al.* (2008), evidenciam o aumento de respostas celulares e humorais dos organismos aquáticos suplementados com probióticos.

Panigrahi *et al.* (2004), alimentando trutas com *Lactobacillus rhamnosus* (JCM1136), demonstraram que o sistema inato imune pode ser alterado, incluindo respostas humorais como o aumento da atividade da lisozima no soro dos peixes. Outro parâmetro importante observado que os probióticos podem alterar é o aumento na capacidade fagocítica. Pirarat *et al.* (2006), demonstraram que tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) suplementadas com *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram aumento desta resposta inflamatória após o desafio com *Edwardsiella tarda*. Já em trabalhos como os de Kim; Austin, (2006b), avaliando a expressão de citocinas em leucócitos de células epiteliais de trutas arco-íris induzidas por probióticos, foi possível averiguar o aumento da expressão gênica de mediadores inflamatórios como IL-1 β e TNF- α nos rins, indicando assim a ocorrência de respostas anti-inflamatórias.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Um dos métodos alternativos de combate às enfermidades bacterianas que merece atenção é o antagonismo ao *quorum sensing*, mecanismo pelo qual as bactérias coordenam a expressão de genes em resposta à densidade populacional bacteriana, produzindo e detectando pequenas moléculas sinalizadoras. Estas moléculas de comunicação bacteriana são produzidas por bactérias Gram negativas e Gram positivas. As moléculas mais estudadas são as denominadas Acyl homoserina lactona (AHL), produzidas apenas pelas bactérias Gram negativas. As AHL podem estar envolvidas na regulação de fatores de virulência que somente são expressos em altas concentrações celulares (FUQUA 2001; CAMILLI; BASSLER, 2006), ou seja, a interrupção da comunicação entre bactérias patogênicas aumenta as chances do hospedeiro resistir à infecção bacteriana reduzindo os graus de virulência das bactérias, não debilitando o sistema de defesa animal (RASCH *et al.*, 2004).

De acordo com Defoirdt *et al.* (2004), existem bactérias probióticas capazes de degradar estas moléculas de comunicação, podendo assim neutralizar a produção de toxinas juntamente com a

produção de substâncias inibitórias e, a exemplo disto, Dong *et al.* (2002) e Rengpipat *et al.* (2003) observaram tais resultados com *Bacillus* spp.

5.1 PREBIÓTICOS E/OU SIMBIÓTICOS

Outro tópico de relevância atualmente é a inclusão de ingredientes na dieta não digeríveis para o hospedeiro estimulando o crescimento ou mesmo ativando o metabolismo de uma ou mais bactérias presentes no trato intestinal, regulando assim o balanço da microbiota benéfica no hospedeiro.

Estas substâncias ou ingredientes são chamados de prebióticos, e dentre elas podemos encontrar os mangoligossacarídeos, lactoses e oligofrutoses, bem como a inulina (GIBSON *et al.*, 2004). Os gêneros bacterianos mais comumente associados à utilização de prebióticos são os *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., entre outras bactérias ácido-láticas. Até a presente data, são poucos os estudos utilizando os prebióticos na aquicultura, ou mesmo a ação conjunta destas substâncias associadas aos probióticos, denominação esta chamada de simbióticos.

De acordo com Verschuere *et al.* (2000), o critério mais importante que deve ser estabelecido na utilização e seleção de bactérias probióticas é a colonização do trato intestinal devido às bactérias possuírem alta tolerância aos ácidos biliares e possuírem capacidade de adesão no epitélio intestinal (NIKOSKELAINEN *et al.*, 2001). Panigrahi *et al.* (2004) demonstraram que a viabilidade e número de bactérias probióticas no trato intestinal de truta arco íris influenciou diretamente as respostas imunológicas, pois quando retirada da dieta os parâmetros imunológicos como a atividade fagocítica e a produção de lisozima voltaram a se restabelecer.

Diversos estudos enfatizam a utilização de ingredientes nas dietas chamados de prebióticos que possibilitam o aumento ou a viabilidade de bactérias probióticas no trato intestinal de animais e humanos descrevendo sinergismo entre as bactérias probióticas e substâncias não digeríveis. Isto beneficia o balanço entre as bactérias benéficas e as patogênicas no trato intestinal (GIBSON *et al.*, 1995; WATZL *et al.*, 2005).

Contudo, Cerezuela *et al.* (2008) efetivaram estudos com dourada *Sparus aurata* Linnaeus, 1758 evidenciando que somente a adição de inulina à dieta não foi capaz de alterar os parâmetros imunes inatos com eficiência, sendo recomendada por Ronkart *et al.* (2009) sua aplicação em outras espécies de peixes e a complementação de probióticos ao

tratamento. A inulina é uma fibra dietética quimicamente composta por uma mistura de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos constituída por frutose de cadeias únicas de vários tamanhos que terminam geralmente em uma única unidade de glicose possuindo diversas características químicas e físicas de acordo com seu processo de fabricação.

Quando o aumento de viabilidade de incorporação de probióticos nas dietas é requerido, existe a possibilidade de utilização dos prebióticos, os quais além de beneficiar o balanço entre as bactérias benéficas e as patogênicas no trato intestinal, promovem também o crescimento específico das bactérias probióticas, especificamente as bactérias ácido láticas e quando aplicados em conjunto com os probióticos são classificados como simbióticos (GIBSON; MCCARTNEY; RASTALL, 2005; FULLER; GIBSON, 1997; GATESOUBE, 2008; MERRIFIELD *et al.*, 2010; YOUSEFIAN; AMIRI, 2009).

Neste contexto, a utilização de prebióticos e/ou probióticos para aquicultura pode se tornar ferramenta na otimização da produção destas espécies, bem como garantir uma aquicultura sustentável sem adição de quimioterápicos (MERRIFIELD *et al.*, 2010).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os probióticos para aquicultura devem ser categorizados ou descritos como micro-organismos vivos, que adicionados aos cultivos aquáticos entrem no trato digestivo dos animais e mantenham-se vivos para atuarem benéficamente no animal de interesse, seja melhorando a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas no trato digestivo. A limitação mais importante no uso de probióticos, em muitos casos, é a não manutenção da concentração dos mesmos no trato intestinal dos animais, existindo assim a necessidade de oferecê-los regularmente em altas concentrações para os organismos aquáticos, o que torna sua aplicação dispendiosa em termos financeiros. Em alguns casos pode-se observar também que resultados *in vitro* não refletem os resultados *in vivo*.

Em resumo, é fundamental na escolha de probióticos a sua seleção baseada em mais de um modo de ação e se, necessária a utilização de mais de um micro-organismo em sua mistura ou mesmo substâncias que propiciem a maximização da chance de sucesso de sua aplicação e que esta seja viável em escalas comerciais.

7 JUSTIFICATIVA

Os problemas ambientais causados pela aquicultura e que podem comprometer a competitividade e sustentabilidade do setor se devem ainda em grande parte à ênfase que é dada ao acréscimo de produtividade e de rentabilidade. O aumento nas taxas de estocagem nos diversos sistemas de produção intensifica também as taxas de arraçoamento. Esse procedimento tem causado deterioração da qualidade da água nos cultivos e conseqüentemente, das condições de sanidade dos organismos cultivados, tornando tais sistemas de produção insustentáveis mesmo a curto prazo. Além disso, a intensificação da produção envolve estresse, resultando no aparecimento de doenças e conseqüentemente de mortalidades na piscicultura. As doenças causadas por bactérias têm grande importância na piscicultura devido ao impacto econômico causado pelas mortalidades das populações dos peixes estocados.

Para a continuidade no crescimento e desenvolvimento da atividade, existe a necessidade de se criar estratégias para a minimização dos efeitos das doenças nos cultivos. A ferramenta mais difundida hoje em dia para o controle de bacterioses é o uso de antibióticos. Porém, estes produtos têm conduzido à seleção de bactérias resistentes e ao acúmulo destes produtos tanto na carne dos peixes, como no ambiente.

Devido à necessidade de se reduzir os efeitos do uso de antibióticos na piscicultura e melhorar o controle e a prevenção de enfermidades em peixes cultivados, técnicas e produtos alternativos para prevenir enfermidades, como o uso de probióticos podem auxiliar na diminuição do impacto ambiental da atividade além de trazer benefícios zootécnicos aos cultivos incrementando a renda das pequenas e grandes propriedades rurais .

Até o momento, as cepas de bactérias utilizadas como probióticas disponíveis no mercado brasileiro são importadas e não tem eficácia comprovada nas condições de cultivo nacional. Ainda, ao utilizar estas cepas, se introduz no ambiente uma bactéria exótica, cuja proliferação é imprevisível. O desenvolvimento de probióticos isolados do trato digestivo do próprio peixe nativo constitui grande esperança para ajudar na solução de problemas da presença de enfermidades na piscicultura.

O desenvolvimento da tecnologia e os detalhes da sua aplicabilidade serão fundamentais para a piscicultura no Brasil, pois além de avaliar o uso de probióticos em espécies nativas, serão avaliados os prebióticos e simbióticos, pouco descritos anteriormente em literatura.

Finalmente, o conhecimento das características hematológicas e de alguns parâmetros imunológicos frente a estes produtos biotecnológicos fornece importantes informações sobre o estado de saúde de peixes cultivados, especialmente dos peixes nativos como o *Pseudoplatystoma* sp. que dentre as espécies nativas possui potencial de cultivo e alto valor de mercado, sendo procurado também por possuir alta qualidade de carne e poucos espinhos intramusculares. Em condições de cultivo chegam a dois quilos em apenas um ano (ROUBACH et al., 2003; CAMPOS, 2004; ZANIBONI-FILHO, 2004).

No Brasil, a linhagem de surubim amplamente comercializada é o surubim híbrido resultante do cruzamento entre o *P. corruscans* e *P. fasciatum*, com o objetivo de explorar a expressão da heterose advinda deste cruzamento (CREPALDI et al. 2006). Em 2007, de acordo com dados da FAO (2008), a produção aquícola de espécies de bagres sul-americanos em águas continentais brasileiras alcançou cerca de 670 toneladas, movimentando montantes em torno de US\$ 1.467.000.

Surto de doenças no inverno no cultivo de surubim já foram citados por Campos (2004), possivelmente causados por bacterioses, levando a sintomas como hemorragia no intestino e ânus, lesões externas e vermelhidão na base das nadadeiras podendo causar mortalidades de até 80% da produção.

Com objetivo de reduzir perdas nos cultivos aquícolas de surubins híbridos urge a carência de estudos que fortaleçam os trabalhos de prevenção frente a bacterioses utilizando ferramentas biotecnológicas como probióticos, prébióticos e simbióticos.

8 OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar bactérias com potencial probiótico para o surubim híbrido do cruzamento de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix e Agassiz, 1829) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus, 1766), avaliando diferentes estratégias de aplicação associadas à utilização de prebióticos em dietas comerciais.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar bactérias ácido-láticas do surubim híbrido de pintado e cachara com potencial probiótico.

- b) Selecionar *in vitro* as cepas de bactérias ácido-láticas com maior potencial probiótico na inibição de diferentes patógenos bacterianos para aquicultura.
- c) Avaliar a colonização do trato intestinal dos peixes alimentados com dietas contendo a cepa bacteriana selecionada na etapa anterior.
- d) Avaliar a inclusão de diferentes concentrações de prebióticos em dieta comercial em relação a colonização da dieta contendo a cepa probiótica selecionada.
- e) Comparar os efeitos dos tratamentos via alimentação, contendo probióticos, prebióticos e simbióticos (probiótico + prebiótico) sobre os parâmetros microbiológicos, hematológicos e imunológicos.
- f) Averiguar após infecção experimental com *Aeromonas hydrophila hydrophila* a aplicação do método que resultou em alguma modulação imunitária positiva nos ensaios anteriores.

9 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo faz referência ao capítulo do livro intitulado: “Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos” organizado por Ângela Teresa Silva-Souza, Maria De Los Angeles Lizama e Ricardo Massato Takemoto. Os demais correspondem cada um a um artigo. O segundo está formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture Research”; o terceiro de acordo com “Aquaculture Nutrition” e o quarto nas normas do “Journal of Fish Diseases”.

CAPITULO 2

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA O SURUBIM HÍBRIDO.

José Luiz Pedreira Mouriño^{1,2*}, Felipe do Nascimento Vieira¹, Adolfo Bezerra Jatobá^{1,2}, Thiago Tetsuo Ushizima³, Bruno Correa da Silva^{1,2}, Gabriella do Vale Pereira¹, Walter Quadros Seiffert¹, Maurício Laterça Martins¹

¹Marine Shrimp Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Brazil

²Laboratory AQUOS -Aquatic Organisms Health, Aquaculture Department, UFSC, Brazil

³Empresa Mar e Terra Ltda, Dourados, Mato Grosso do sul, Brasil.

*Artigo formatado de acordo com as normas do periódico “Aquaculture Research”

10 RESUMO

O presente trabalho investigou cepas bacterianas com potencial probiótico isoladas do trato intestinal de bagres híbridos sadios entre pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*). Foram utilizados para o isolamento da cepa 20 híbridos com $1,5 \pm 0,3$ kg. Na seleção *in vitro* das 41 cepas de bactérias isoladas, somente 10 apresentaram halos maiores que 10 mm na avaliação do antagonismo frente *Aeromonas hydrophila* e destas somente 5 apresentaram halos maiores que 9 mm para patógenos conhecidos. Nos ensaios de viabilidade de produção *in vitro*, as 5 cepas selecionadas alcançaram concentrações maiores que 10^5 UFC.mL⁻¹ nos tubos contendo caldo MRS. No entanto, somente a cepa *Weissella cibaria* alcançou 10^6 UFC.mL⁻¹ na dieta, sendo capaz de reduzir o pH do meio de cultura Caldo MRS para 3,85. No ensaio *in vivo*, foram utilizados 72 híbridos sadios e após 15 dias de alimentação, foi possível detectar a alteração na microbiota intestinal pela cepa potencialmente candidata a probiótico, bem como aumento no número total de eritrócitos comparado ao grupo controle. Este trabalho demonstrou que a bactéria *Weissella cibaria* pode ser considerada potencial probiótico para o surubim híbrido.

PALAVRAS CHAVE: *Weissella cibaria*, probiótico, peixes nativos.

11 ABSTRACT

This study investigated bacterial strains with probiotic potential that were isolated from the intestinal tract of healthy hybrid catfish from the cross of spotted sorubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) and barred sorubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*). Twenty hybrids weighing 1.5 ± 0.3 kg were used for bacterial isolation. *In vitro* selection with 41 strains of bacteria revealed only ten that demonstrated zones of inhibition greater than 10 mm in the antagonism evaluation against *Aeromonas hydrophila*; only five of those strains presented zones of inhibition greater than 9 mm against known pathogens. In the *in vitro* tests of production viability, the five selected strains reached concentrations greater than 10^5 CFU.mL⁻¹ in tubes containing MRS media. However, only *Weissella cibaria* reached 10^6 CFU.mL⁻¹ in MRS and was able to reduce the pH of the media to 3.85. In the *in vivo* intestinal colonisation studies, 72 healthy hybrids were used. After 15 days of feeding colonisation, microbiota alterations were detected with the potential probiotic strain. An increase in the number of erythrocytes compared to the control group was also detected. This study showed that *Weissella cibaria* could be considered a potential probiotic for *Pseudoplatystoma* sp.

KEYWORDS: *Weissella cibaria*, probiotic, native fish.

12 INTRODUÇÃO

Peixes do gênero *Pseudoplatystoma* encontrados nas bacias do Rio Uruguai-Paraguai, Paraná e São Francisco pertencem à família Pimelodidae. Podem alcançar 152 cm de comprimento (Agostinho et al. 2003) e apresentam grande importância econômica no Brasil (Roubach et al. 2003). Em 2007, de acordo com dados da FAO (2008), a produção aquícola de espécies de bagres sul-americanos em águas continentais brasileiras alcançou cerca de 670 toneladas, movimentando montantes em torno de US\$ 1.467.000.

De acordo com Moraes, Martins (2004), com o rápido crescimento da produção destas espécies, surgiram também problemas relacionados à patologia animal. Dentre as patologias encontradas, as de origem bacteriana causam grandes perdas econômicas e muitas vezes provocam sintomas subclínicos e/ou sem sintomas aparentes (Martins et al. 2008). Na prevenção e controle destas enfermidades em sistema de cultivo intensivo na aquicultura, os antibióticos tornaram-se uma ferramenta de rotina e em consequência houve maior número de cepas bacterianas patogênicas resistentes aos quimioterápicos e inclusive causando poluição ambiental (Del Cerro et al. 2010, Martinez 2009, Alcaide et al. 2005).

Uma alternativa para minimizar o uso inapropriado de quimioterápicos na aquicultura é a utilização de probióticos como profilaxia. Existe hoje considerável interesse no uso de bactérias probióticas para o aumento da resistência aos patógenos bem como crescimento dos animais no sistema de produção aquícola (Verschuere et al. 2000). Sua utilização reduz com eficácia a incidência de enfermidades ou pelo menos reduz a severidade em casos de surtos de mortalidade, definindo assim os probióticos como micro-organismos vivos, que administrados em concentrações adequadas conferem benefício principalmente à saúde do hospedeiro (Reid 2008).

Existem diversos trabalhos sobre o uso de probióticos relacionando parâmetros hemato-imunológicos em peixes tais como Panigrahi et al. (2004, 2005, 2007) e Balcazar et al. (2009). No Brasil, Jatobá et al. (2008), utilizando bactérias ácido-láticas isoladas do próprio trato intestinal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) como probiótico, obteve melhoria e alteração no sistema imunológico após infecção experimental com *Enterococcus durans*, alterando também a comunidade bacteriana do trato intestinal.

O presente trabalho investigou cepas bacterianas isoladas do trato intestinal de bagres híbridos do cruzamento entre pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766) com potencial probiótico, além da capacidade de adesão ao epitélio intestinal após 15 dias de alimentação.

13 MATERIAL E MÉTODOS

13.1 SELEÇÃO DE POTENCIAIS CEPAS PROBIÓTICAS

Foram utilizados 20 híbridos do cruzamento de pintados machos (*P. corruscans*) e fêmeas cachara (*P. fasciatum*) sadios com $1,5 \pm 0,3$ kg, provenientes da Empresa Mar e Terra Ltda (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil), sendo a escolha do tanque de onde os peixes tiveram origem, a não utilização de químicos ou antimicrobianos durante o cultivo. Os animais foram anestesiados com 0,01% de benzocaína e seus intestinos extirpados assepticamente e lavados com solução salina estéril (0,5% de NaCl) para remoção de bactérias não aderidas à parede intestinal. O tecido retirado foi homogeneizado com solução salina estéril na proporção de 1:1 com a amostra, o sobrenadante retirado e semeado em placas de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) Agar (HIMEDIA[®]) seletivo para bactérias ácido láticas. As placas semeadas foram incubadas a 35°C por 48h. Após o crescimento as colônias, foram então re-semeadas e plaqueadas no mesmo meio a 35°C por mais 48h para assegurar a pureza e confirmar a morfologia característica do gênero *Lactobacillus* pelo método de Gram.

As cepas de bactérias patogênicas utilizadas para determinação do antagonismo in vitro foram: *Aeromonas hydrophila hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM), *Aeromonas sobria* (isolado de peixes sintomáticos), *Vibrio harveyi* (ATCC 14126), *Vibrio alginolyticus* (isolado de surtos de enfermidade em *Litopennaeus vannamei*), *Vibrio anguillarum* (cepa referência cedida pela Dra. Marguerita Barraco da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil), *Enterococcus durans* (ATCC 19492), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (D363), *Micrococcus luteus* (A270) e *Staphylococcus aureus* (ATCC) e *Vibrio alginolyticus* (isolado por Martins *et al.* 2009). Para este ensaio de inibição bacteriana as cepas acima foram reativadas, cultivadas e mantidas em Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid[®]) a 30°C por 24 h.

Para a seleção *in vitro*, foi proposto o antagonismo tanto de patógenos para o *Pseudoplatystoma* sp. bem como outros patógenos para aquicultura. Sendo assim, as cepas isoladas foram primeiramente avaliadas frente à inibição por *Aeromonas hydrophila* (CPQBA228-08 DRM) de acordo com a técnica de Disco Agar Difusão (WDA) descrita por Ramírez et al., (2006). Os isolados foram semeados na concentração de 10^5 UFC.mL⁻¹ em placas de Petri contendo Agar MRS e incubados a 35°C por 24 horas. Após este período, discos de 1 cm de diâmetro foram retirados dessas placas. A cepa de *A. hydrophila* patogênica foi semeada em placas de Petri contendo o meio Agar TSA, e os discos retirados das placas de MRS foram sobrepostos na superfície da mesma recém semeada com o patógeno para serem incubadas a 30°C por 24 horas. Sendo a atividade antagonista expressa nos diâmetros (mm) da zona de inibição ao redor dos discos de agar sobrepostos em triplicata.

As dez cepas com maior capacidade antagonista a *A. hydrophila*, foram caracterizadas fenotipicamente por meio do kit de identificação API 50CH (API, BioMerieux, Hazelwood, MO, USA), utilizado na identificação de bactérias ácido lácticas através da fermentação de 49 carboidratos. Os resultados do kit foram interpretados de acordo com o software APIWEB (API, BioMerieux, Hazelwood, MO, USA). Estas foram avaliadas quanto a inibição em WDA para os 10 patógenos descritos acima, a fim de selecionar somente 5 cepas com maior potencial antimicrobiano. Para selecionar e avaliar os resultados de inibição, de acordo com metodologia descrita anteriormente, os dados obtidos receberam diferentes pesos de importância para os diferentes patógenos; os patógenos específicos receberam importância 3, os patógenos não específicos para aquicultura de águas continentais e para as águas marinhas, peso 2 e 1 respectivamente. Para o ensaio de inibição por WDA com os patógenos marinhos (*Vibrios* spp.), o meio de cultura Agar TSA foi enriquecido com 2% de NaCl. Todas as culturas bacterianas foram checadas quanto a pureza rotineiramente por esgotamento em placas e coloração pelo método de GRAM.

13.2 ESTUDO DE VIABILIDADE DE PRODUÇÃO

As 5 cepas selecionadas foram submetidas a testes de viabilidade de inoculação em dieta comercial para peixes carnívoros contendo 45% de proteína bruta (PB) e capacidade de produção de ácidos orgânicos por meio da acidificação do meio de cultura por determinação de pH.

As cepas selecionadas foram testadas frente à enumeração de unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹) em tubos contendo

meio de cultura líquido MRS com pH 6, a 35°C por 48 horas. Após esta incubação, para cada cepa avaliada foi mensurada a concentração de íons de hidrogênio dissociados (pH), assegurando a produção de ácidos orgânicos, responsáveis por grande parte da inibição de bactérias patogênicas Gram negativas.

A dieta experimental extrusada utilizada para a inoculação das bactérias ácido lácticas apresentou os seguintes níveis de garantia de acordo com o fabricante: Cálcio (máx) 25,00g/kg, Extrato Etéreo (mín.) 100,00g/kg, Fósforo (Mín.) 10,00g/kg, Matéria Fibrosa (máx.) 15,00g/kg, Matéria Mineral (máx.) 100,00g/kg, Proteína Bruta (mín.) 400,00g/kg Umidade (máx.) 120,00g/kg. Sobre a dieta foram aspergidas na concentração de 200 mL.Kg⁻¹ dos tubos contendo as bactérias ácido-láticas selecionadas. Três amostras de 1 g de cada dieta contendo a bactéria foram maceradas com 1 mL de solução salina estéril a 1,5% e diluídas serialmente 9 vezes (1/10). As diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁹ foram semeadas em meio de cultura Agar MRS a 35°C por 48 horas, afim de se estimar a concentração da bactérias selecionada na dieta, alcançando a concentração desejada de 10⁶ UFC.g⁻¹.

13.3 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

Foram utilizados 72 híbridos sadios com aproximadamente 21 cm de comprimento e 65 g de peso, provenientes da Empresa Mar e Terra Ltda (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil). A cepa bacteriana com capacidade de produção de ácidos orgânicos e maior enumeração de UFC.mL⁻¹ no meio de cultura MRS, foi repicada e incubada à 35°C por 24 h, até alcançar a concentração de 10⁷ UFC.mL⁻¹ mensurada por espectrofotometria a 505 nm para a inoculação das dietas.

13.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 12 caixas circulares de 100 L, com aeração e aquecimento constante (26,0±0,5 °C) e sistema de filtração biológica independente dos demais para assegurar a manutenção da qualidade da água (pH 6,8-7,2). A água dos tanques foi mantida límpida, sendo efetuada diariamente renovação da água e a retirada dos sedimentos do fundo dos tanques de acordo com o monitoramento da amônia total. Durante o período do experimento a qualidade da água foi a seguinte: pH 6,8±0,2, amônia total 1,2±0,4 mg.L⁻¹ e oxigênio dissolvido 8,5 mg.L⁻¹. Os peixes foram distribuídos em número de seis animais por caixa, aclimatados por 5 dias antes de receberem as dietas experimentais 2 vezes ao dia durante 15 dias com as dietas teste e controle (sem adição

de bactérias). Cada tratamento, um com dieta controle comercial sem inoculação da bactéria e a outra com inoculação da bactéria foram distribuídos aleatoriamente nos tanques de forma a se ter 6 repetições para cada tratamento.

13.5 COLETA DE AMOSTRAS

Ao término do experimento, os peixes de cada unidade experimental foram amostrados, anestesiados com benzocaína (1g:10 L) e o sangue coletado por punção do vaso caudal em 2 seringas de 3 mL (21G), uma contendo anticoagulante EDTA 10% (anticoagulante) e outra sem anticoagulante. O sangue com anticoagulante foi utilizado para realizar as análises hematológicas e o sangue sem anticoagulante permaneceu em repouso durante 1 h a 25°C para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a 1400 g por 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo armazenado a -20°C para as análises de glicose.

13.6 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

O sangue coletado com seringa contendo anticoagulante foi utilizado para confecção de duplicatas de extensões sanguíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald (Rosenfeld, 1947), para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb et al., 1971) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para quantificar o número total de eritrócitos em hemocitômetro. Os números totais de trombócitos e leucócitos foram obtidos na extensão sanguínea pelo método indireto descrito por Martins et al. (2004). Uma alíquota do soro foi utilizada para determinação do índice glicêmico em espectrofotômetro a 505 nm de acordo com a recomendação pelo fabricante pelo kit glicose Biotécnica®.

13.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO TRATO INTESTINAL

Os tratos intestinais dos peixes amostrados de cada tanque foram extirpados com auxílio de pinças e bisturi, homogeneizados em solução salina estéril em um graal, diluídos serialmente (1/10), semeados em meio de cultura Agar TSA (contagem total de bactérias heterotróficas), MRS (bactérias ácido-láticas), Centremid (seletivo para *Pseudomonas* sp.) e TCBS (seletivo para vibrionáceas) e incubados em estufa a 30°C. Foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias após 24h da incubação nos meios de cultura Agar TSA, Agar Centremid

e TCBS e 48h depois no meio Agar MRS. Das colônias crescidas em MRS, foi feita a coloração pelo método de Gram, para seleção e posterior re-isolamento.

13.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados quanto à homogeneidade de variância pelo teste Bartlett (Zar 1996). Caso observada heterogeneidade de variâncias os dados foram transformados para $\log(x+1)$ para os dados de contagens microbiológicas e hemogramas. Os experimentos foram avaliados por t-teste com nível de significância de 5% (Zar 1996).

13.9 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Após os ensaios anteriores a bactéria selecionada foi identificada molecularmente na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a amplificação do gene do RNAr 16S por PCR. Os fragmentos de DNAr amplificados foram purificados em coluna (*GFX PCR DNA e GEL Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram p10f, 765f, 782r e p1100r e suas seqüências parciais obtidas com diferentes *primers* montadas em um *coting* (sequencia única combinando os diferentes fragmentos obtidos), os quais foram comparados com as seqüências de organismos representadas no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e no RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Para análise filogenética foi relacionada a sequencia selecionada com a do organismo desconhecido.

14 RESULTADOS

14.1 SELEÇÃO DE POTENCIAIS CEPAS PROBIÓTICAS

Na seleção preliminar foram isoladas 41 cepas de bactérias, sendo que todas as colônias apresentaram morfologia característica de ácido-láticas, Gram-positivas (Tabela 2). Destas cepas somente 10 apresentaram halos maiores que 10 mm pela metodologia WDA (Tabela 3), sendo identificadas como *Lactobacillus confusus* (3 cepas), *Lactobacillus brevis* (3 cepas), *Lactococcus lactis lactis* (2 cepas) e somente duas cepas não tiveram identificação validada pelo kit de identificação API 50CH.

Destas cepas, as que apresentaram médias maiores do que 9 mm na formação dos halos de inibição frente aos outros dez patógenos foram: *Lactobacillus brevis* (P6), *Lactobacillus brevis* (P13), *Lactococcus lactis lactis* (P29), *Lactobacillus brevis* (P33) e *Lactobacillus confusus* (P36) (Tabela 3). Já nos ensaios de viabilidade de produção, as 5 cepas selecionadas alcançaram concentrações maiores que 10^5 UFC.mL⁻¹ nos tubos contendo caldo MRS. No entanto, somente a cepa *Lactobacillus confusus* (P36) alcançou 10^6 UFC.g⁻¹ na dieta já preparada, sendo capaz de reduzir o pH do meio de cultura Caldo MRS para 3,85 (Tabela 4).

Tabela 2 - Atividade antagonista* e morfologia de bactérias ácido láticas Gram positivas isoladas de intestinos de *Pseudoplatystoma* sp. contra *Aeromonas hydrophila hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM).

| Cepas | Morfologia | Halos Inibição (mm) | Cepas | Morfologia | Halos Inibição (mm) |
|-------|-------------|---------------------------|-------|-------------|---------------------------|
| P1 | bacilos | 0,00 | P22 | cocos | 8,50 |
| P2 | bacilococos | 10,00 | P23 | cocos | 0,00 |
| P3 | cocos | 0,00 | P24 | cocos | 0,00 |
| P4 | bacilos | 10,00 | P25 | cocos | 5,33 |
| P5 | bacilos | 9,33 | P26 | cocos | 8,50 |
| P6 | bacilos | 10,50 | P27 | bacilococos | 5,33 |
| P7 | cocos | 0,00 | P28 | bacilococos | 12,00 |
| P8 | cocos | 0,00 | P29 | cocos | 10,33 |
| P9 | cocos | 5,33 | P30 | bacilococos | 0,00 |
| P10 | cocos | 0,00 | P31 | bacilococos | 0,00 |
| P11 | bacilococos | 8,33 | P32 | cocos | 0,00 |
| P12 | cocos | 0,00 | P33 | bacilos | 14,00 |
| P13 | bacilos | 10,67 | P34 | cocos | 0,00 |
| P14 | cocos | 12,33 | P35 | bacilos | 10,33 |
| P15 | cocos | 0,00 | P36 | bacilos | 11,00 |
| P16 | cocos | 9,33 | P37 | cocos | 8,50 |
| P17 | cocos | 8,33 | P38 | cocos | 0,00 |
| P18 | cocos | 0,00 | P39 | cocos | 9,33 |
| P19 | cocos | 0,00 | P40 | cocos | 0,00 |
| P20 | cocos | 3,00 | P41 | cocos | 9,00 |
| P21 | cocos | 8,67 | | | |

*Mensurado pelo diâmetro ou zona de inibição formada ao redor dos discos contendo as cepas bacterianas candidatas a probióticos pelo método de Disco Agar Difusão (WDA).

Tabela 3 - Atividade antagonista* de bactérias ácido lácticas isoladas de intestinos de *Pseudoplatystoma* sp. contra *Aeromonas hydrophila*, *Hydrophila* (AH), *Aeromonas sobria* (AS), *Vibrio harveyi* (VH), *Vibrio alginolyticus* (VA), *Vibrio anguillarum* (VAN), *Enterococcus durans* (ED), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Escherichia coli* (EC), *Micrococcus luteus* (ML), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Vibrio cholera* (VC).

| Cepas | Espécies | Halos de inibição (mm) | | | | | | | | | | | | | Média final |
|-------|----------------------------------|------------------------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|-------------|
| | | AH | AS | PA | ED | VC | EC | ML | SA | VA | VAN | VH | | | |
| P2 | N | 7,83 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 11,33 | 6,00 | 9,33 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 6,50 | 5,50 | 7,15 | |
| P4 | <i>Lactobacillus confusus</i> | 9,00 | 8,00 | 8,17 | 6,00 | 10,33 | 10,00 | 8,50 | 9,00 | 7,00 | 7,00 | 6,60 | 7,40 | 8,26 | |
| P6 | <i>Lactobacillus brevis</i> | 11,33 | 8,83 | 8,17 | 6,00 | 10,17 | 10,33 | 9,00 | 10,00 | 6,90 | 8,33 | 8,20 | 9,01 | | |
| P13 | <i>Lactobacillus brevis</i> | 9,00 | 8,00 | 10,00 | 6,00 | 14,50 | 10,33 | 16,50 | 8,17 | 8,00 | 7,50 | 6,50 | 9,47 | | |
| P14 | <i>Lactococcus lactis lactis</i> | 8,33 | 6,00 | 8,33 | 6,00 | 9,83 | 8,33 | 14,50 | 8,00 | 6,30 | 6,00 | 6,00 | 7,91 | | |
| P28 | N | 8,33 | 6,00 | 8,00 | 6,00 | 9,33 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 7,33 | 5,33 | 6,00 | 7,08 | | |
| P29 | <i>Lactococcus lactis lactis</i> | 9,33 | 6,00 | 15,00 | 6,00 | 11,33 | 8,33 | 13,00 | 8,33 | 7,50 | 6,33 | 6,00 | 9,07 | | |
| P33 | <i>Lactobacillus brevis</i> | 10,67 | 6,00 | 9,17 | 8,33 | 11,33 | 10,33 | 14,00 | 7,67 | 7,33 | 11,30 | 8,33 | 9,45 | | |
| P35 | <i>Lactobacillus confusus</i> | 9,00 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 13,83 | 9,17 | 13,67 | 6,00 | 7,40 | 8,00 | 9,20 | 8,48 | | |
| P36 | <i>Weissella cibaria</i> | 9,33 | 6,00 | 8,67 | 6,00 | 14,50 | 11,83 | 11,33 | 8,67 | 8,33 | 11,25 | 10,00 | 9,40 | | |

*Mensurado pelo diâmetro ou zona de inibição formada ao redor dos discos contendo as cepas candidatas à probióticos pelo método de disco Agar difusão. Para a confecção da média final da inibição foram dados diferentes pesos de importância para os diferentes patógenos; os patógenos específicos receberam importância 3, os patógenos não específicos para aquicultura de águas continentais e para as água marinhas, peso 2 e 1 respectivamente. Legenda: N - não identificado.

Tabela 4 - Viabilidade de produção na incorporação de diferentes bactérias ácido lácticas em dieta comercial e avaliação de íons de hidrogênio dissociados (pH) em tubos de caldo MRS, a 35°C por 48 h.

| Cepas | Caldo MRS (UFC.mL ⁻¹) | pH | Ração (UFC.g ⁻¹) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------|------------------------------|
| <i>Lactobacillus brevis</i> (P6) | 1,20x10 ⁵ | 4,50 | 1,20x10 ³ |
| <i>L. brevis</i> (P13) | 5,10x10 ⁶ | 4,40 | 2,10x10 ⁴ |
| <i>L. lactis lactis</i> (P29) | 2,20x10 ⁵ | 4,13 | 1,20x10 ⁴ |
| <i>L. brevis</i> (P33) | 2,12x10 ⁶ | 4,20 | 1,20x10 ⁴ |
| <i>Weissella cibaria</i> (P36) | 1,00x10 ⁷ | 3,85 | 1,00x10 ⁶ |

14.2 ENSAIO IN VIVO

De acordo com a Tabela 5, foi observado que a colonização do trato intestinal por *Weissella cibaria* (P36) alcançou um valor 1000x superior ao grupo controle. Este resultado evidencia a colonização do trato intestinal e demonstra o potencial deste grupo de bactérias, em colonizar o trato intestinal de peixes do gênero *Pseudoplatystoma*.

A adição desta mesma cepa na dieta foi capaz de diminuir a carga bacteriana de bactérias gênero *Streptococcus* que crescem seletivamente em meio de cultura Agar KF. Os valores das concentrações de bactérias totais, vibriónicas e do grupo das Gram negativas as *Pseudomonas* respectivamente, não diferenciam estatisticamente dos grupos tratados e não tratados, apesar de apresentarem concentrações bacterianas inferiores ao grupo controle.

Tabela 5 - Diferentes gêneros de bactérias expressos em concentrações bacterianas baseadas em log de Unidades Formadoras de colônias por gramo de intestino ($\log(x+1)$ UFC.g⁻¹) de bagres híbridos entre pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), tratado e não com a cepa *Weissella cibaria* (P36) candidata à probiótica, sob diferentes meios de cultura padrão. Letras que diferem entre si, indicam diferença significativa pelo t-teste ($P < 0,05$).

| Tratamento | Heterotróficas totais | Vibrionaceae | Ácido lácticas | <i>Pseudomonas</i> spp | <i>Streptococcus</i> spp |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Controle | 6,58 ±1,13 ^a | 5,32 ±0,45 ^a | 0,60 ±1,04 ^a | 5,63 ±1,95 ^a | 3,38±0,45 ^a |
| <i>Weissella cibaria</i> (P36) | 5,71 ±0,14 ^a | 4,76 ±0,44 ^a | 3,72 ±0,98 ^b | 4,76 ±0,72 ^a | 2,27±0,07 ^b |

14.3 HEMATOLOGIA

Analisando os parâmetros hematológicos contidos na Tabela 6, observa-se que os animais que receberam a suplementação com a bactéria *W. cibaria* (P36) apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) na contagem total de eritrócitos. No entanto, para os demais parâmetros sanguíneos analisados não houve diferença significativa.

Tabela 6- Parâmetros hematológicos de híbridos de bagres híbridos entre pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*P. fasciatum*) alimentados e não alimentados com a cepa *Weissella cibaria* na concentração de 10^7 UFC.g⁻¹ de ração. Contagens totais de eritrócitos (RBC), de leucócitos (WBC), de trombócitos (TTC), percentual de hematócrito (HTC), basófilos (BAS), eosinófilos (EOS), leucócito granular PAS positivo (LG-PAS), neutrófilos (NEU), linfócitos (LIM), monócitos (MON) e taxa de glicose (GLC). As letras entre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

| Parâmetros hematológicos | Tratamentos | |
|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| | <i>W. cibaria</i> | Controle |
| RBC ($\times 10^6 \mu.L^{-1}$) | 1,85±1,6 a | 1,57±1,5 b |
| TTC ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 50,84±6,3 a | 36,72±14,0 a |
| WBC ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 52,34±6,9 a | 44,41±15,2 a |
| HTC (%) | 24±4,9 a | 23,2±6,7 a |
| BAS ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 0 | 0 |
| EOS ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 0,3±0,1 a | 0,75±0,75 a |
| LG-PAS ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 0,99±0,8 a | 1,29±0,4 a |
| NEU ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 2,66±1,8 a | 2,22±2,3 a |
| LIM ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 38,34±14,0 a | 34,83±17,1 a |
| MON ($\times 10^3 \mu.L^{-1}$) | 3,48±1,9 a | 2,15±1,6 a |
| GLC (mg.dL ⁻¹) | 47,27±12,7 a | 30,72±9,3 a |

14.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A cepa avaliada no ensaio de colonização teve sua identificação molecularmente confirmada como *W. cibaria*, sendo mantida na coleção de micro-organismos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

15 DISCUSSÃO

Diferentemente ao observado por Caipang et al. (2010) e Jatobá et al. (2008), os quais isolaram *in vitro* somente 4 e 6 cepas, respectivamente em bacalhau (*Gadus morhua*) e tilápia, neste estudo 41 cepas foram isoladas, sendo que 10 apresentaram halos de inibição contra várias bactérias maiores do que 9 mm (Tabela 2). Tais resultados corroboraram as observações de Fjellheim et al. (2010) e Huys et al. (2001), que para o bacalhau do atlântico e linguado (*Scophthalmus maximus* Linnaeus 1758) respectivamente, foram necessários isolar cerca de 120 a 500 cepas para se obter uma cepa com o potencial probiótico requerido.

Caipang et al. (2010) e Jatobá et al. (2008), ao avaliar o antagonismo *in vitro* de bactérias probióticas frente aos patógenos mais comuns tanto para o bacalhau do atlântico, como para a tilápia, respectivamente, encontraram grande dissimilaridade na capacidade inibitória dos isolados bacterianos.

Corroborando os resultados presentes e estratégia de seleção, Pan et al. (2008) avaliaram *in vitro* o antagonismo e a habilidade de adesão a culturas de células intestinais para selecionar uma cepa candidata a probiótica. Neste caso, *Clostridium butyricum* CB2c foi capaz de inibir *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio anguillarum*.

Weissella cibaria foi capaz de reduzir o pH do meio de cultura Caldo MRS para 3,85, resultado que comprova a produção de ácidos orgânicos e até peróxido de hidrogênio na inibição de bactérias Gram positivas (Vazquez et al. 2005). Alguns autores descreveram este antagonismo a bactérias Gram negativas para potenciais probióticos isolados de diferentes organismos aquáticos. *Lactobacillus plantarum* isolado de tilápias (Jatobá et al. 2008) e outros *Lactobacillus* sp. isolados de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) (Balcazar et al. 2008, Balcazar et al. 2007a, Sugita et al. 2007, Vazquez, Gonzalez, Murado 2005).

Outro parâmetro na escolha da cepa probiótica, de acordo com Vine et al. (2004) é a viabilidade de produção em larga escala, pois se o micro-organismo possuir maior velocidade de crescimento em meios de cultura específicos ou mesmo a dieta, consequentemente indicará maior competitividade *in vitro* e em processos comerciais de produção de inóculo. Panigrahi et al. (2005, 2007) avaliando a viabilidade de incorporação na dieta por *Lactobacillus rhamnosus*, obtiveram resultados de 10^9 e 10^{11} UFC.g⁻¹ de dieta, diferindo do obtido para o surubim híbrido, os quais não passaram de 10^6 UFC.g⁻¹ de dieta.

A importância de isolar o probiótico do próprio animal estudado foi sugerida por Balcazar et al. (2006), os quais enfatizaram que esta característica apresenta maior possibilidade de colonização do animal pela bactéria probiótica. Neste trabalho, a colonização do trato intestinal pela cepa P36 alcançou valores de 10^4 UFC.g⁻¹ de intestino, perdendo somente 2 casas decimais da dieta fornecida. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Vendrell et al. (2008), onde as contagens se mantiveram em 10^6 UFC.g⁻¹ de dieta.

Jatobá et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste ensaio, onde a colonização do trato intestinal da tilápia por *L. plantarum* foi de aproximadamente 10^6 UFC.mL⁻¹ sendo que a dieta continha 10^8 UFC.mL⁻¹. Porém com esta concentração no trato intestinal das tilápias já foi possível observar diminuição de bactérias do gênero *Pseudomonas* diferentemente da cepa P36 para o pintado, pois somente foi possível detectar diferença no grupo das bactérias que crescem em meio de cultura Agar KF, como os *Enterococcus* sp.

Diversos autores além de descrever a colonização e alteração da microbiota intestinal pelo uso de bactérias ácido-láticas, descreveram a alteração de parâmetros tanto hematológicos como imunológicos sendo que o principal modo de ação foi a estimulação do sistema imunológico inato (Balcazar et al. 2007a, b, 2009, Vendrell et al. 2008, Gomez & Balcazar 2008).

De acordo com Gomez & Balcazar (2008), para se obter um resultado desejado na alteração dos parâmetros hemato-imunológicos os probióticos devem alcançar concentrações elevadas dentro do trato intestinal, o que difere do resultado obtido neste trabalho onde foi possível detectar diferença na contagem total de eritrócitos e alteração da microbiota intestinal, mesmo estando a cepa *W. cibaria* (P36) em concentração baixa (10^4 UFC.mL⁻¹) na dieta.

De acordo com Panigrahi et al. (2005) membros do gênero *Lactobacillus* têm sido utilizados em produtos alimentícios como

organismos probióticos, bactérias geralmente consideradas seguras. A acentuada imunidade concedida por *L. rhamnosus* JCM 1136, pelas evidências em estudos anteriores, confirmam que a suplementação na dieta com probióticos definidos podem ser efetivos meios bioterapêuticos ou profiláticos na aquicultura. A exemplo, Balcazar et al. (2007b) observaram que durante um surto de furunculose em trutas arco íris sem sintomatologia da enfermidade, estas possuíam concentração elevada de bactérias ácido lácticas no trato intestinal, especialmente *Lactococcus lactis*, *L. plantarum*, e *Lactobacillus fermentum*, bactérias caracterizadas como probióticas em literatura por produzirem antagonismo frente à bactérias patogênicas.

De acordo com Verschuere et al. (2000), o critério mais importante que deve ser estabelecido na utilização e seleção de bactérias probióticas é a colonização do trato intestinal devido às bactérias possuírem alta tolerância aos ácidos biliares e possuírem capacidade de adesão ao epitélio intestinal (Joborn et al. 1997, Nikoskelainen et al. 2001).

Para trabalhos futuros existe a possibilidade de alteração de meios de cultura e utilização de aditivos como os prebióticos para aumento da concentração de bactérias ácido-láticas nas dietas conforme também sugerido por Yousefian & Amiri (2009).

16 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível isolar cerca de 41 cepas bacterianas do trato digestivo de bagres híbridos entre pintado e cachara, bem como selecionar tanto *in vitro* como *in vivo* cepas potencialmente probióticas. Destas, *Weissella cibaria* foi considerada candidata à bactéria probiótica.

17 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Mar e Terra LTDA pelo fornecimento dos peixes e pela concessão de auxílios e bolsas juntamente com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Edital 64 MAPA/CNPq, processo 577657/2008-9), pela bolsa de Produtividade em Pesquisa CNPq (301072/2007-8) a M.L. Martins e ao Ministério da Pesca e Aquicultura, Republica Federativa do Brasil, pela infra-estrutura concedida.

18 REFERÊNCIAS

- Agostinho A.A., Gomes L.C., Suzuki H.I. & Júlio Jr. H.F. (2003) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin Brazil. In: *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*.(ed. by Carolsfeld J.B., Harvey C., Baer,R. & Baer A.) Vitoria, World Bank.
- Alcaide E., Blasco M.D. & Esteve C. (2005) Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 3348-3350.
- Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D. & Muzquiz J.L. (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **114**, 173-186.
- Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Vendrell D., Calvo A.C., Marquez I., Girones O. & Muzquiz J.L. (2007a) Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition* **97**, 522-527.
- Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Vendrell D., Girones O. & Muzquiz J. L. (2007b) Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fems Immunology and Medical Microbiology* **51**, 185-193.
- Balcazar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I. & Muzquiz J.L. (2009) Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in Brown Trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **17**, 153-157.
- Balcazar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Muzquiz J.L. & Girones O. (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* **278**, 188-191.
- Caipang C.M.A., Brinchmann M.F. & Kiron V. (2010) Antagonistic activity of bacterial isolates from intestinal microbiota of Atlantic cod, *Gadus morhua*, and an investigation of their immunomodulatory capabilities. *Aquaculture Research* **41**, 249-256.

- Del Cerro A., Marquez I. & Prieto J.M. (2010) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. *Journal of Fish Diseases* **33**, 285-291.
- FAO (2009) FIGIS - *Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service*.
- Fjellheim A.J., Klinkenberg G., Skjermo J., Aasen I.M. & Vadstein O. (2010) Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology* **144**, 153-159..
- Goldenfarb P.B., Bowyer F.P., Hall E. & Brosius E. (1971) Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology* **56**, 35-39.
- Gomez G.D. & Balcazar J.L. (2008) A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **52**, 145-154.
- Huys L., Dhert P., Robles R., Ollevier F., Sorgeloos P. & Swings J. (2001) Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture* **193**, 25-37.
- Jatoba A., Vieira F.D., Neto C.B., Silva B.C., Mourino J.L.P., Jeronimo G.T., Dotta G. & Martins M.L. (2008) Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **43**, 1201-1207.
- Joborn A., Olsson J.C., Westerdahl A., Conway P.L. & Kjelleberg S. (1997) Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases* **20**, 383-392.
- Martinez J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157**, 2893-2902.
- Martins M.L., Pilarsky F., Onaka E.M., Nomura D.T., Fenerick Jr J., Ribeiro K., Myazaki D.M.Y., Castro M.P. & Malheiros E.B. (2004) Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim Instituto de Pesca* **30**, 71-80.

- Martins M.L., Mouriño J.L.P., Amaral G.V., Vieira F.N., Dotta G., Bezerra A.J.M., Pedrotti F.S., Jerônimo G.T., Buglione-Neto C.C. & Pereira-Jr. G. (2008) Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 631-637.
- Moraes F.R. & Martins M.L. (2004) Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. (ed. by Cyrino J.E.P., Urbinati E.C., Fracalossi D.M. & Castagnolli N. São Paulo, TecArt.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A., Salminen S. & Bylund G. (2001) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* **198**, 229-236.
- Pan X., Wu T., Zhang L., Song Z., Tang H. & Zhao Z. (2008) In vitro evaluation on adherence and antimicrobial properties of a candidate probiotic *Clostridium butyricum* CB2 for farmed fish. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 1623-1629.
- Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh 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.
- Panigrahi A., Kiron V., Puangkaew J., Kobayashi T., Satoh S. & Sugita H. (2005) The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **243**, 241-254.
- Panigrahi A., Kiron V., Satoh S., Hirono I., Kobayashi T., Sugita H., Puangkaew J. & Aoki T. (2007) Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 372-382.
- Ramírez C., Ciffoni B.G.A., Pancheniak E.M.G. & Soccol E.F.R.C. (2006) Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. *La Alimentación Latinoamericana* **264**, 70-77.
- Reid G. (2008) Probiotics and prebiotics - Progress and challenges. *International Dairy Journal* **18**, 969-975.
- Rosenfeld G. (1947) Pancromic stain for haematology and clinical cytology. A new combination of the components May-Grünwald and Giemsa in just one formula for rapid staining. *Memorias Instituto do Butantan* **20**, 329-334.

- Roubach R., Correia E.S., Zaiden S.F., Martino R.C. & Cavalli R.O. (2003) Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture* **34**, 28-34.
- Sugita H., Ohta K., Kuruma A. & Sagesaka T. (2007) An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. *Aquaculture Research* **38**, 1002-1004.
- Vazquez J.A., Gonzalez M.P. & Murado M.A. (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* **245**, 149-161.
- Vendrell D., Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Girones O. & Muzquiz J.L. (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **31**, 337-345.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. & Verstraete W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 655-+.
- Vine N.G., Leukes W.D. & Kaiser H. (2004) In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *Fems Microbiology Letters* **231**, 145-152.
- Yousefian M. & Amiri M.S. (2009) A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology* **8**, 7313-7318.
- Zar J.H. (1996) *Biostatistical analysis*, Upper Saddle River, NJ.

CAPITULO 3

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM INULINA E *Weisella cibaria* SOBRE OS PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS EM SURUBINS HÍBRIDOS.

José Luiz Pedreira Mouriño^{1,2*}, Felipe do Nascimento Vieira¹,
Adolfo Bezerra Jatobá^{1,2}, Bruno Correa da Silva^{1,2}, Gabriel Fernandes
Alves Jesus¹, Walter Quadros Seiffert¹, Mauricio Laterça Martins².

¹Marine Shrimp Laboratory, Aquaculture Department, Federal
University of Santa Catarina (UFSC), Brazil

²Laboratory AQUOS - Aquatic Organisms Health, Aquaculture
Department, UFSC, Brazil

*Artigo formatado nas normas do periódico “Aquaculture
Nutrition”.

19 RESUMO

Este estudo avaliou a influência da adição de prebióticos, probióticos ou ambos na alimentação de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) sobre a microbiota intestinal autóctone e parâmetros hematológicos e imunológicos. Cento e sessenta peixes foram distribuídos em 4 tratamentos com 4 repetições cada e alimentados por 15 dias com dieta controle sem suplementação, dieta com 0,5% de inulina (Prebiótico), dieta suplementada somente com *Weissella cibaria* (Probiótico) e dieta com 0,5% de inulina + *W. cibaria* (Simbiótico). No intestino dos animais alimentados com suplementação do simbiótico houve maior concentração de bactérias ácido lácticas e menores concentrações de *Vibrio* spp. e *Pseudomonas* spp. Aumento no número de eritrócitos e redução no de neutrófilos circulantes foi observado nos peixes alimentados com a dieta simbiótica. Não houve diferença nas concentrações de glicose, proteína e lisozima sérica sanguínea entre os tratamentos. Porém, observou-se maior concentração de imunoglobulina total nos peixes alimentados com probiótico e simbiótico. Este estudo comprovou que a utilização de prebiótico inulina a 0,5% juntamente com a cepa probiótica *W. cibaria* na alimentação de surubim híbridos de *Pseudoplatystoma* spp. equilibram a relação entre o número de bactérias patogênicas e benéficas da microbiota intestinal, e possivelmente melhorem seu sistema de defesa imunológico.

PALAVRAS-CHAVE: Peixe, probiótico, prebiótico, simbiótico, hematologia, imunologia.

20 ABSTRACT

This study evaluated the dietary supplementation of prebiotics, probiotics or both in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. Fasciatum*) on the autochthonous intestinal microbiota and haematological and immunological parameters. A total of 160 fish were divided into 4 treatments with 4 replicates each. Fish were fed with the following diets for 15 days: control diet without supplementation; 0.5% inulin (prebiotic) supplementation; *Weissella cibaria* (probiotic) supplementation; or 0.5% inulin and *W. cibaria* (symbiotic) supplementation. The intestines of symbiotic supplemented-fish showed higher concentrations of lactic acid bacteria and lower levels of *Vibrio* spp. and *Pseudomonas* spp. An increase in the erythrocyte number and a decrease in the circulating neutrophils were observed in symbiotic supplemented-fish. There was no difference in blood glucose, serum protein and lysozyme levels amongst the treatments. Nevertheless, higher concentration of total immunoglobulin was observed in fish fed probiotic and symbiotic diets. The addition of 0.5% inulin (prebiotic) and *W. cibaria* (probiotic) in the diet of *Pseudoplatystoma* hybrid surubim did equilibrate the ratio between the number of pathogenic bacteria and benefic intestinal flora. These results possibly improved the fish immune system.

KEYWORDS: fish, probiotic, prebiotic, symbiotic, haematology, immunology

21 INTRODUÇÃO

Bagres do gênero *Pseudoplatystoma*, apresentam grande importância econômica tanto para a pesca quanto para o cultivo (Barthem & Goulding 1997; Roubach *et al.* 2003; Crepaldi *et al.* 2006). Em 2007, de acordo com dados da FAO, a produção aquícola destas espécies de bagres em águas continentais no Brasil alcançou cerca de 670 toneladas, movimentando montantes em torno de US\$1.467.000 (FAO 2009).

De acordo com Resende (2009) no desenvolvimento de estratégias de produção destas espécies nativas brasileiras, destaca-se a nutrição em relação à saúde dos animais em cultivo, principalmente na manutenção de sua competência imunitária, capacidade em resistir à enfermidades (Merrifield *et al.* 2010).

Merrifield *et al.* (2009) descreveram a diversidade microbiana alóctone e autóctone da mucosa intestinal de trutas arco íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) observando *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* em cerca de 80% da microbiota alóctone e 60 % da microbiota autóctone. Segundo estes autores, esta comunidade microbiana gastrointestinal está relacionada diretamente com a nutrição e saúde do hospedeiro. Sendo assim, a composição de micro-organismos benéficos versus patogênicos pode resultar em efeitos positivos para os animais quando incorporados às dietas.

Para potencializar a incorporação de probióticos nas dietas, pode-se utilizar prebióticos, substâncias não digeríveis que beneficiam o balanço entre as bactérias benéficas e as patogênicas no trato intestinal, promovendo o crescimento específico das cepas probióticas ou ácido láticas. (Gibson *et al.* 2005; Fuller & Gibson 1997; Gatesoupe 2008; Merrifield *et al.* 2010; Yousefian & Amiri 2009).

A utilização de bactérias ácido láticas apresentam efeito registrado em diversas espécies, como robalos (*Centropomus* spp.), tilápias (*Oreochromis* spp.) e até camarões (Vieira *et al.* 2007), devido à sua capacidade de colonizar o trato digestivo alterando a dominância natural da microbiota intestinal e promovendo melhoria no sistema imune dos animais (Carnevali *et al.* 2006; Jatobá *et al.* 2008; Vieira *et al.* 2008; Vieira *et al.* 2007). Estes resultados estão relacionados com a alta especificidade entre o micro-organismo probiótico e o hospedeiro, pois todas as cepas utilizadas nestes trabalhos foram isoladas dos próprios animais em estudo.

Neste contexto, a utilização de prebióticos e/ou probióticos para aquicultura torna-se ferramenta adequada para otimizar a produção destas espécies, bem como garantir uma aquicultura sustentável sem adição de quimioterápicos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de prebióticos, probióticos e/ou simbióticos (prebióticos+probiótico) influencia a microbiota intestinal autóctone e parâmetros hematológicos e imunológicos em surubim.

22 MATERIAL E MÉTODOS

22.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A cepa bacteriana probiótica utilizada foi *Weissella cibaria*, isolada e selecionada a partir de surubins híbridos. Esta foi repicada e incubada a 35°C por 48 h em Caldo MRS (Difco®), para a manutenção da viabilidade e concentração de 10⁹ UFC.mL⁻¹.

Foram utilizados 160 surubins híbridos sadios, à partir do cruzamento do macho de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz 1829) e da fêmea de cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766), com aproximadamente 73,57±19,5 g de peso e 23,68±1,9 cm de comprimento, provenientes da Empresa Mar e Terra Ltda (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil).

22.2 PREPARO DA DIETA

Foram utilizadas 3 concentrações distintas de inulina (Orafti® HPX) em dieta comercial (Douramix®-Revolution Alevino-Tabela 8) para definição da concentração de inulina a ser incorporada na dieta. A dieta comercial foi previamente moída e preparada 16 amostras de 250 Gramas de dieta adicionadas as concentrações de 0,00; 0,25; 0,50 e 1,00% de inulina para homogeneização em misturador Y com capacidade para 20 kg durante 15 min. Depois de homogeneizadas, as misturas passaram por um processo de peletização e secagem por 18h a 45°C com circulação de ar.

Tabela 7- Níveis de garantia da dieta utilizada no estudo, Douramix®- Revolution Alevino.

| Composição informada | g.kg ⁻¹ de dieta |
|------------------------|-----------------------------|
| Cálcio (máx) | 35,0 |
| Extrato Etéreo (min.) | 120,0 |
| Fósforo (Min.) | 20,0 |
| Matéria Fibrosa (máx.) | 30,0 |
| Matéria Mineral (máx.) | 120,0 |
| Proteína Bruta (mín.) | 400,0 |
| Umidade (máx.) | 120,0 |

Posteriormente, a ração foi aspergida com 100 mL.kg⁻¹ do inoculo de *W. cibaria* na concentração de 10⁹ UFC.mL⁻¹. As dietas então foram secas em estufa com circulação de ar a 35°C por 24 h. Três amostras de 1g das diferentes dietas já contendo o inóculo foram maceradas com 1 mL de solução salina estéril a 0,65% e diluídas serialmente 9 vezes (1/10). As diluições 10⁻⁵ a 10⁻⁹ foram plaqueadas em meio de cultura Agar MRS (Difco®) a 35°C por 48 horas. Todas as quatro dietas (0; 0,25; 0,5 e 1% de inulina) foram preparadas em quadruplicata e armazenadas em sacos plásticos por 3 meses à temperatura ambiente (23°C) em sala com desumidificador de ambiente. Mensalmente foram retiradas amostras para quantificação de bactérias ácido lácticas totais para definição da concentração de inulina que propicie aumento na concentração e viabilidade ao longo do tempo de bactérias probióticas na dieta.

22.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 160 peixes foram distribuídos em 16 caixas circulares de 100 L com aeração e aquecimento com termostato (26±0,5 °C) e 10 animais por caixa. Cada caixa possuía um sistema de filtragem biológica independente dos demais para assegurar a manutenção da qualidade de água. A água dos tanques foi mantida límpida, sendo efetuada diariamente renovação de 30 % da água e a retirada dos sedimentos do fundo dos tanques. Durante o ensaio, a qualidade de água manteve-se em: oxigênio dissolvido 8,5±0,5 mg.L⁻¹; amônia total 1,0±0,5 mg.L⁻¹; nitrito 0,25±0,2 mg.L⁻¹ e pH 7,0±0,3.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos tanques, de forma a se ter 4 repetições para cada tratamento delineadas inteiramente

ao acaso, aclimatados durante 5 dias. Os peixes foram alimentados por 15 dias, 4 vezes ao dia com as diferentes dietas: dieta controle sem suplementação, dieta suplementada com 0,5% de inulina (Prebiótico), dieta suplementada somente com *Weissella cibaria* (Probiótico) e dieta suplementada com 0,5% de inulina acrescida de *W. cibaria* (Simbiótico).

As 4 dietas experimentais utilizadas no ensaio de colonização foram preparadas como descrito acima, alcançando a concentração de 10^7 UFC.g⁻¹ nos grupos onde houve inoculação de *W. cibaria*.

22.4 PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS

Ao término do experimento, 5 peixes de cada unidade experimental foram amostrados, anestesiados com benzocaína (1g:10L) e o sangue coletado por punção do vaso caudal em 2 seringas de 3 mL (21G), uma contendo anticoagulante EDTA e outra sem anticoagulante. O sangue com anticoagulante foi utilizado para realizar as análises hematológicas e o sangue sem anticoagulante foi realizado um pool dos 5 peixes de cada unidade experimental, e este permaneceu em repouso durante aproximadamente 1 h a 25°C para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a 1400g por 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo e armazenamento a -20°C.

Uma alíquota do soro foi utilizada para determinação do índice glicêmico em espectrofotômetro, 505 nm de acordo com a recomendação pelo fabricante pelo kit glicose Biotécnica®.

A atividade da lisozima no soro sanguíneo foi determinada pela metodologia adaptada de Sankaran & Gurnani (1972), onde uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (Sigma-Aldrich) foi diluída em tampão PBS (0.04M Na₂HPO₄, pH 6.2) na concentração de 0.50mg.mL⁻¹, imediatamente antes de sua utilização. Trinta microlitros do soro, em triplicata do pool, foi semeado em microplaca (96 micropoços com fundo chato) e adicionado 200 µL da suspensão de células de *M. lysodeikticus* em cada poço. Após incubar as microplacas por 20 minutos a 35°C, as absorbâncias iniciais e finais das amostras foram medidas em 550nm e a taxa de redução na absorvência das amostras foi convertida para concentração de lisozima (µg.ml⁻¹) determinada pela curva padrão realizada com lisozima de clara de ovos da galinha (HEWL, Sigma-Aldrich).

A proteína total do soro sanguíneo foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Bradford & Williams 1976. A concentração de imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito

por Amar *et al.* (2000), onde 100 µL do soro foi misturado com 100 µL de solução de polyethylene glycol (PEG, 10 000 MW, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) 12% e a mistura incubada á temperatura ambiente por 2 horas para precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5000 g a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante retirado e mensurada a quantidade de proteína total (Bradford & Williams 1976), utilizando-se soroalbumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em mg.mL⁻¹, sendo calculada pela formula:

Total Ig (mg.mL⁻¹) = (proteína total do soro – proteína total tratada com PEG). Vol⁻¹

O sangue coletado com seringa contendo anticoagulante foi utilizado para confecção de duplicatas de extensões sanguíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald (Rosenfeld 1947), para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb *et al.* 1971) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para quantificar o número total de eritrócitos em hemocitômetro. Os números totais de trombócitos e leucócitos foram obtidos na extensão sanguínea pelo método indireto descrito por Martins *et al.* (2008).

22.5 MICROBIOTA DO TRATO-INTESTINAL

Os tratos intestinais dos peixes amostrados de cada tanque foram extirpados com o auxílio de pinças e tesouras, homogeneizados com solução salina estéril 0,65% em um graal, diluídos serialmente (1/10), e as diluições 10⁰ a 10⁻⁶ semeados em meio de cultura Agar TSA (bactérias heterotróficas totais), Agar MRS (bactérias ácido-láticas), Agar Cetrimid (Pseudomonas) e Agar TCBS (Vibrio) e incubados em estufa a 30°C. Foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias após 24h da incubação nos meios de cultura Agar TSA, Agar Cetrimid e Agar TCBS e 48h depois no Agar MRS. Das colônias crescidas em MRS, foram feitas a coloração de Gram.

22.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos *in vivo*, os dados obtidos foram avaliados quanto à homogeneidade de variância pelo teste Bartlett. Sendo observado heterogeneidade de variâncias os dados foram transformados

para log (x+1) (para os dados de contagens microbiológicas e hemogramas), arco seno (para dados de sobrevivência) ou raiz quadrada (para os demais dados). Posteriormente os dados foram avaliados por análise de variância com nível de significância de 5%. Caso detectado diferença significativa, foram submetidos ao teste Tukey de separação de médias ($\alpha < 0,05$) (Zar 1996).

23 RESULTADOS

As dietas que utilizaram 0,5 e 1% de inulina em sua formulação apresentaram médias superiores às dos grupos controle e com 0,25% de incorporação. Porém, não diferiram entre si, sendo assim, visando o custo da incorporação deste ingrediente funcional, seria interessante adicionar a menor concentração do produto que apresentasse efeito na colonização da ração (Tabela 8).

Tabela 8 - Contagens bacterianas de dietas contendo diferentes concentrações de inulina (Orafti® HPX) inoculadas com *Weissella cibaria*.⁽¹⁾

| Tratamentos | Contagens microbiológicas Log UFC.gr ⁻¹ | | | |
|------------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Mês 1 | Mês 2 | Mês 3 | Mês 4 |
| Controle | 6,43 ± 0,2 ^a | 6,80 ± 0,2 ^a | 5,98 ± 0,3 ^a | 5,38 ± 0,2 ^a |
| Inclusão 0,25% inulina | 6,35 ± 0,2 ^a | 6,48 ± 0,2 ^a | 5,89 ± 0,3 ^a | 5,14 ± 0,3 ^a |
| Inclusão 0,5% inulina | 7,87 ± 0,2 ^b | 6,77 ± 0,1 ^a | 6,18 ± 0,3 ^a | 5,20 ± 0,2 ^a |
| Inclusão 1% inulina | 7,77 ± 0,4 ^b | 6,20 ± 0,3 ^a | 5,89 ± 0,2 ^a | 5,08 ± 0,1 ^a |

⁽¹⁾Médias ± desvio-padrão seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

As concentrações bacterianas no intestino dos peixes suplementados com *W. cibaria* e com dieta simbiótica, em meio de cultura seletivo para *Vibrio* apresentaram valores inferiores aos grupos que receberam somente prebiótico e o grupo controle, mesmo não influenciando sobre as concentrações de bactérias heterotróficas totais. Já para *Pseudomonas*, houve redução significativa na concentração apenas quando os aditivos foram fornecidos mutuamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Contagens bacterianas do trato intestinal de surubins híbridos alimentados com dieta controle e suplementados com 0,5% de inulina, *Weissella cibaria*, e dieta simbiótica (0,5% de inulina na dieta + *Weissella cibaria*).

| Tratamentos | Contagem bacteriana Log UFC.gr ⁻¹ | | | |
|----------------------------------|--|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Bactérias Totais | <i>Vibrios</i> | Ácido Láticas | <i>Pseudomonas</i> |
| Dieta controle | 7,46±1,17 ^a | 4,64±1,06 ^b | 1,54±0,06 ^a | 4,86±0,23 ^a |
| 0,5% inulina | 7,62±0,97 ^a | 4,15±0,36 ^b | 4,87±0,30 ^b | 3,03±0,20 ^{ab} |
| <i>W. cibaria</i> | 5,91±0,81 ^a | 0,75±0,90 ^a | 4,68±0,61 ^b | 3,68±0,42 ^{ab} |
| <i>W. cibaria</i> + 0,5% inulina | 6,21±0,36 ^a | 1,90±0,60 ^a | 7,07±1,11 ^c | 2,23±1,48 ^b |

⁽¹⁾Médias±desvio-padrão seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Houve influência sobre a concentração de bactérias ácido láticas totais, sendo que os animais que receberam somente um ou outro aditivo apresentaram valores de colonização do trato intestinal de 4,87±0,30 e 4,68±0,61 Log UFC.g⁻¹ de intestino para prebiótico e probiótico, respectivamente, diferente do grupo controle que apresentou a concentração de 1,54±0,06 Log UFC.g⁻¹ de intestino. Já o grupo tratado com os dois aditivos (simbiótico), os valores da concentração de bactérias ácido láticas foi de 7,07±1,11 Log UFC.g⁻¹ de intestino, diferenciando dos demais grupos (Tabela 9).

Quanto aos parâmetros hematológicos, os animais alimentados com dieta simbiótica apresentaram maior número total de eritrócitos (P<0,05). Na contagem diferencial de leucócitos, os peixes alimentados com dieta probiótica e simbiótica apresentaram menor número de neutrófilos circulantes (Tabela 11). Para os demais parâmetros hematológicos não houve influência dos tratamentos.

Tabela 10 - Parâmetros hematológicos em surubins híbridos alimentados com dieta controle e suplementados com 0,5% de inulina, *Weissella cibaria* e dieta simbiótica (0,5% de inulina na dieta + *Weissella cibaria*).

| Células Sanguíneas | Dieta controle | 0,5% inulina | <i>W. cibaria</i> | <i>W. cibaria</i> +0,5% inulina |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Eritrócitos (x10 ⁶ .mL ⁻¹) | 1,76 ± 0,03 ^a | 1,88 ± 0,05 ^a | 1,77 ± 0,09 ^a | 1,99 ± 0,02 ^b |
| Trombócitos (x10 ³ .mL ⁻¹) | 17,0 ± 0,38 ^a | 24,5 ± 0,36 ^a | 19,0 ± 0,28 ^a | 20,8 ± 0,19 ^a |
| Leucócitos (x10 ³ .mL ⁻¹) | 39,4 ± 0,39 ^a | 46,3 ± 0,95 ^a | 53,7 ± 1,56 ^a | 51,4 ± 0,98 ^a |
| Linfócito (x10 ³ .mL ⁻¹) | 35,5 ± 0,32 ^a | 46,2 ± 0,82 ^a | 51,1 ± 1,57 ^a | 52,1 ± 0,67 ^a |
| Monócito (x10 ³ .mL ⁻¹) | 0,94 ± 1,95 ^a | 0,76 ± 2,71 ^a | 0,53 ± 0,71 ^a | 0,75 ± 2,48 ^a |
| Eosinófilo (x10 ³ .mL ⁻¹) | 0,19 ± 0,62 ^a | 0,34 ± 1,62 ^a | 0,28 ± 0,94 ^a | 0,29 ± 1,88 ^a |
| Basófilo (x10 ³ .mL ⁻¹) | 0,66 ± 1,19 ^a | 0,54 ± 1,49 ^a | 0,66 ± 2,71 ^a | 0,47 ± 1,61 ^a |
| Neutrófilo (x10 ³ .mL ⁻¹) | 1,66 ± 3,91 ^b | 1,45 ± 1,40 ^b | 0,89 ± 2,22 ^a | 0,88 ± 0,49 ^a |
| Hematócrito (%) | 21,11 ± 3,47 ^a | 21,08 ± 1,73 ^a | 20,21 ± 4,52 ^a | 18,38 ± 1,54 ^a |

⁽¹⁾Médias±desvio-padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

As concentrações de glicose, proteína e atividade de lisozima não diferiram entre os tratamentos (p>0,05). Porém, observou-se maior concentração de imunoglobulina total (P<0,05) nos peixes alimentados com dieta probiótica e simbiótica quando comparado com os peixes controle (Tabela 12).

Tabela 11 - Parâmetros imunológicos em surubins alimentados com dieta controle e suplementados com 0,5% de inulina, *Weissella cibaria*, e dieta simbiótica (0,5% de inulina na dieta + *Weissella cibaria*).

| Tratamentos | Glicose (mg dL ⁻¹) | Proteína (mg.mL ⁻¹) | Ig total (mg.mL ⁻¹) | Lisozima (µg.mL ⁻¹) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Dieta controle | 62,27±2,45 ^a | 17,64±2,06 ^a | 1,80±0,58 ^a | 7,78±0,03 ^a |
| 0,5% inulina | 68,39±4,08 ^a | 14,60±2,08 ^a | 4,17±0,84 ^{ab} | 7,53±0,81 ^a |
| <i>W. cibaria</i> | 67,49±4,44 ^a | 13,44±0,73 ^a | 7,43±1,44 ^b | 7,78±0,57 ^a |
| <i>W. cibaria</i> + 0,5% inulina | 62,35±4,13 ^a | 16,09±1,50 ^a | 7,17±2,47 ^b | 8,95±0,59 ^a |

⁽¹⁾Médias± desvio-padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

24 DISCUSSÃO

De acordo com Bowden (2008), os avanços na compreensão dos impactos ambientais ou alterações no ambiente podem identificar áreas específicas da função imune revelando que além de parâmetros de qualidade de água, diversas partículas e fatores podem influenciar a função imune nos peixes. Neste contexto, as pesquisas envolvendo prebióticos, probióticos e simbióticos sobre a sanidade animal são de extrema importância para a compreensão e modificação da microbiota intestinal de organismos aquáticos (Merrifield *et al.* 2010; Gibson *et al.* 2005; Fuller & Gibson 1997).

O trato intestinal dos animais por ser um ambiente rico em nutrientes e por possuir diferentes perfis típicos de populações bacterianas intestinais, possibilitam que ingredientes funcionais ou aditivos alimentares alterem estas comunidades bacterianas. A inulina utilizada como prebiótico neste estudo, provém de ingredientes à base de frutanos, não sendo totalmente digeríveis ao longo do trato intestinal e que ademais disso podem contribuir para o desempenho zootécnico dos animais, melhorando o funcionamento intestinal devido ao prolongado efeito bifidogênico destes ingredientes, o que aumenta a população de bactérias ácido lácticas ao longo do trato intestinal (Pompei *et al.* 2008; Van Loo 2007).

Avaliando o crescimento microbiano de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus delbrueckii* durante um período de 48h na presença de diferentes substratos como betaglucanos, xylo-oligossacarídeos, arabinoxylo-oligossacarídeos, inulina, oligofrutose e glicose,

Rurangwaet *al.*(2009) observaram maior crescimento das bactérias em todos aqueles substratos exceto nos que continham somente glicose. Neste caso, a fermentação de carboidratos por estes micro-organismos foi dominada pela produção de ácidos, como os ácidos graxos de cadeia curta, resultado que reflete a mesma viabilidade de incorporação na dieta encontrada no presente resultado, com valor de pH 3,8 nos meios de cultura com *W. cibaria* e aumento de colonização das bactérias ácido lácticas.

O aumento na concentração de bactérias ácido lácticas no trato intestinal de surubim alimentado com dieta contendo inulina neste ensaio, está de acordo com as observações de Burr *et al.* (2008), os quais avaliaram os efeitos da levedura de cerveja, fruto-oligosacarídeos, e GroBiotic-A, sobre a comunidade microbiana intestinal de “red drum”.

A suplementação com *W. cibaria* influenciou o sistema imunológico dos peixes neste experimento, fato comprovado pela produção de imunoglobulinas totais no soro sanguíneo dos animais. Este resultado foi uma evidencia que corrobora diversos trabalhos sobre o uso de bactérias ácido-láticas como probiótico para peixes, podendo existir abundância na microbiota intestinal de peixes de água doce e que estas bactérias podem estimular o sistema imunológico dos peixes (Gatesoupe 2008; Jatoba *et al.* 2008; Nikoskelainen *et al.* 2003; Panigrahi *et al.* 2007; Panigrahi *et al.* 2005; Panigrahi *et al.* 2004).

Buentello *et al.* (2010) estudaram os efeitos de dieta adicionada com fruto-oligosacarídeos, manangoligosacarídeos, transgalactooligosaccharídios e GroBiotic-A sobre o ganho de peso, eficiência alimentar e imunidade inespecífica de “red drum“ (*Sciaenops ocellatus* Linnaeus 1766), encontrando valores de atividade de lisozima sérica superiores nos animais suplementados com 1% de prebiótico na dieta. Similarmente, Panigrahi *et al.* (2009), observaram aumento da atividade da lisozima em truta arco-íris alimentada com *Lactobacillus rhamnosus*, contrariamente ao observado neste estudo. Porém, estes autores observaram maiores valores de imunoglobulinas totais em animais suplementados com *L. rhamnosus*, corroborando as observações do presente estudo. Já Wang *et al.* (2008) analisando o efeito de *Enterococcus faecium* ZJ4 sobre o crescimento e resposta imunológica de tilápias, observaram que após 40 dias, os peixes suplementados com a bactéria não apresentaram diferença significativa na concentração de proteína total sérica, bem como na concentração de imunoglobulina. Porém, neste estudo os autores observaram maior peso final e ganho de

peso diário das tilápias suplementadas com *E. faecium* do que aqueles alimentados com a dieta basal.

Cerezuela *et al.* (2008), ao avaliar a resposta imunológica inata *in vitro* em “gilthead seabream” (*Sparus aurata* Linnaeus 1758) suplementados com inulina, não verificaram influência sobre a incubação de leucócitos medida pela peroxidase, fagocitose, *burst* respiratório e atividade citotóxica natural. Porém, em seus estudos *in vivo*, a suplementação inibiu a fagocitose e o *burst* respiratório de leucócitos.

Os aditivos alimentares e/ou suplementos, atualmente constituem uma promessa na substituição do antibióticos, sendo que os prebióticos possuem grande potencial na manutenção da saúde dos peixes (Merrifield *et al.* 2010).

Li & Gatlin (2005), estudaram o efeito do prebiótico Grobiotic® (R), para híbridos de “white bass” (*Morone chrysops* Rafinesque, 1820 x *M. saxatilis* Walbaum 1792) expostos à infecção crônica por *Mycobacterium marinum* e verificaram melhor desempenho de crescimento em peixes alimentados com as dietas suplementadas. Neste trabalho, os peixes alimentados apenas com 2% do prebiótico comercial apresentaram maior sobrevivência (80%) em comparação aos tratamentos suplementados com 1 e 2% de levedura de cerveja e 2% GroBiotic (R)-A (72-73%) após 21 dias de tratamento. A conclusão destes autores reflete a melhoria do desempenho zootécnico sob condições de infecção crônica, sendo esta uma etapa a ser estudada em futuros trabalhos com peixes para se ter uma resposta precisa e mais bem estudada sobre a suplementação de prebióticos ou conjunta com probióticos.

Em conclusão, os surubins híbridos do gênero *Pseudoplatystoma* quando suplementados com *W. cibaria* juntamente com prebióticos tem potencializado os efeitos probióticos da suplementação conjunta, havendo alteração da microbiota intestinal como também dos parâmetros hemato-imunológicos sugerindo uma imunomodulação positiva.

25 REFERÊNCIAS

- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., & Watanabe, T. (2000) Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.*, **66**, 1068-1075.

- Barthem, R.B. & Goulding, M. (1997) *Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos.*, SCM/ CNPq/ Ipaam, Amazonas.
- Bowden, T.J. (2008) Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunol.*, **25**, 373-383.
- Bradford, M.M. & Williams, W.L. (1976) New, Rapid, Sensitive Method for Protein Determination. *Fed. Proc.*, **35**, 274-274.
- Buentello, J.A., Neill, W.H. & Gatlin, D.M. (2010) Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquac. Res.*, **41**, 411-418.
- Burr, G., Hume, M., Ricke, S., Nisbet, D. & Gatlin, D., (2008) A preliminary in vitro assessment of GroBiotic-A, brewer's yeast and fructooligosaccharide as prebiotics for the red drum *Sciaenops ocellatus*. *J. Environ. Sci. Health B.*, **43**, 253-260.
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Olivotto, I., Silvi, S. & Cresci, A. (2006) Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, **258**, 430-438.
- Cerezuela, R., Cluesta, A., Meseguer, J. & Esteban, M.A. (2008) Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish & Shellfish Immunol.*, **24**, 663-668.
- Crepaldi, D.V., Faria, P.M.C., Teixeira, E.d.A., Ribeiro, L.P., Costa, Á.A.P., Melo, D.C.d., Cintra, A.P.R., Prado, S.d.A., Costa, F.A.A., Drumond, M.L., Lopes, V.E. & Moraes, V.E.D. (2006) The Brazilian catfish in Brazil aquaculture. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, **30**, 150-158.
- FAO (2009) FIGIS - *Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service*.
- Fuller, R. & Gibson, G.R. (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, **222**, 28-31.

- Gatesoupe, F.J. (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. and Biotechnol.*, **14**, 107-114.
- Gibson, G.R., McCartney, A.L. & Rastall, R.A. (2005) Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br. J. Nutr.*, **93** Suppl 1, S31-34.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. & Brosius, E. (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, **56**, 35-39.
- Jatoba, A., Vieira, F.D., Neto, C.B., Silva, B.C., Mourino, J.L.P., Jeronimo, G.T., Dotta, G. & Martins, M.L. (2008) Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesq. Agrop. Bras.*, **43**, 1201-1207.
- Li, P. & Gatlin, D.M. (2005) Evaluation of the prebiotic GroBiotic (R)-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M.saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*, **248**, 197-205.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. & Lilius, E.M. (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, **15**, 443-452.
- Martins, M.L., Pilarsky, F., Onaka, E.M., Nomura, D.T., Jr., F., Ribeiro, K., Myazaki, D.M.Y., Castro, M.P. & Malheiros, E.B. (2004) Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca.*, **30**, 71-80.
- Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Amaral, G.V., Vieira, F.N., Dotta, G., Bezerra, A.J.M., Pedrotti, F.S., Jerônimo, G.T., Buglione-Neto, C.C. & Pereira-Jr., G. (2008) Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 631-637.
- Merrifield, D.L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S.J. & Baker, R.T.M. (2009) Microbial community diversity associated with the intestinal

- mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult. Res.*, **40**, 1064-1072.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex, M. & Ringo, E. (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, **302**, 1-18.
- Nayak, S.K. (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, **29**, 2-14.
- Panigrahi, A., Azad, I.S., Das, B.K., Dandpat, J., Das, G., Behera, S. & Mishra, S.S. (2009) Probiotic induced immunomodulation: investigation into the cellular and molecular mechanism involved. *Res. J. Biotechnol.*, **4**, 7-13.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. & Sugita, H. (2004) Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **102**, 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. & Sugita, H. (2005) The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **243**, 241-254.
- Panigrahi, P., Braileanu, G.T., Chen, H. & Stine, O.C. (2007) Probiotic bacteria change *Escherichia coli*-induced gene expression in cultured colonocytes: Implications in intestinal pathophysiology. *World. J. Gastroenterol.*, **13**, 6370-6378.
- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U.M., Matteuzzi, D. & Rossi, M. (2008) In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe*, **14**, 280-286.
- Resende, E.K.d. (2009) Research in network in aquaculture: technological basis for sustainable development of aquaculture in Brazil. *Aquabrazil. Rev. Bras.Zootec.*, **38**, 52-57.
- Rosenfeld, G. (1947) Pancromic stain for haematology and clinical cytology. A new combination of the components May-Grünwald and

- Giernsa in just one formula for rapid staining. *Mem. Inst. Butantan*, **20**, 329-334.
- Roubach, R., Correia, E.S., Zaiden, S.F., Martino, R.C. & Cavalli, R.O. (2003) Aquaculture in Brazil. *World Aquac.*, **34**, 28-34.
- Rurangwa, E., Laranja, J.L., Van Houdt, R., Delaedt, Y., Geraylou, Z., Van de Wiele, T., Loo, J., Van Craeyveld, V., Courtin, C.M., Delcour, J.A. & Ollevier, F. (2009) Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. *J. Appl. Microbiol.*, **106**, 932-940.
- Sankaran, K. & Gurnani, S. (1972) Variation in Catalytic Activity of Lysozyme in Fishes. *Indian J. Bioch. Biophysics*, **9**, 162-&.
- Van Loo, J. (2007) How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well-being in livestock and companion animals. *J. Nutr.*, **137**, 2594S-2597S.
- Vieira, F.N., Buglione, C.C., Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Ramires, C., Martins, M.L., Barracco, M.A.A.M. & Vinatea, L.A. (2008) Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulation. *Pesq. Agropec. Bras.*, **43**, 763-769.
- Vieira, F.N., Pedrotti, F.S., Buglione, C.C., Mouriño, J.L.P., Beltrame, E., Martins, M.L., Ramires, C. & Vinatea, L.A. (2007) Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz. J. Ocean.*, **4**, 251-255.
- Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T. & Li, W.F. (2008) Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, **277**, 203-207.
- Yousefian, M. & Amiri, M.S. (2009) A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African J. Biotechnol.*, **8**, 7313-7318.
- Zar, J.H. (1996) *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, NJ

CAPITULO 4**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM DIFERENTES
SIMBIÓTICOS PARA O SURUBIM HÍBRIDO DESAFIADO
COM *Aeromonas hydrophila***

José Luiz Pedreira Mouriño^{1,2*}, Felipe do Nascimento Vieira¹, Adolfo Bezerra Jatobá^{1,2}, Bruno Correa da Silva^{1,2}, Robert dos Santos¹, Walter Quadros Seiffert¹, Maurício Laterça Martins²

¹Marine Shrimp Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Brazil

²Laboratory AQUOS - Aquatic Organisms Health, Aquaculture Department, UFSC, Brazil

*Formatado nas normas do periódico “Journal of Fish Diseases”.

26 RESUMO

O presente trabalho investigou o efeito de diferentes simbióticos na alimentação de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) após desafio com *Aeromonas hydrophila*. 336 peixes foram distribuídos em 24 caixas circulares de 100L e alimentados durante 20 dias com dieta sem suplementação, suplementada com *Weissella cibaria*, com inulina e com *Lactobacillus plantarum* e inulina, totalizando 9 tratamentos, 3 tratamentos sem desafio e 3 tratamentos para o desafio com *Aeromonas hydrophila* e mais 3 para o desafio com solução tamponada. Após 24 horas do desafio os animais tratados com *W.cibaria* apresentaram índices de mortalidade inferiores aos do grupo controle e tratados com *L. plantarum* ($7,55\pm 3,78$; $31,48\pm 9,32$ e $33,06\pm 7,94\%$ respectivamente). Houve aumento nos números de eritrócitos, trombócitos, leucócitos, linfócitos, LG-pas e neutrófilos circulantes nos animais suplementados. Observou-se aumento na atividade de lisozima e proteína sérica total nos peixes suplementados em relação aos não suplementados. As concentrações de imunoglobulinas totais séricas dos peixes alimentados com simbiótico *W. cibaria* foram maiores do que os alimentados com *L. plantarum* ($8,34\pm 0,19$ mg.mL⁻¹ e $7,36\pm 0,95$ mg.mL⁻¹). O efeito da suplementação com diferentes simbióticos em surubim alterou os parâmetros hematológicos. Quando avaliada a sobrevivência após o desafio com *A. hydrophila*, os animais alimentados com o simbiótico *W. cibaria* isolada de surubins apresentaram maior sobrevivência, cerca de 20% maior do que os alimentados com *L. plantarum* isolada de tilápias.

PALAVRAS CHAVE: Infecção experimental, Probióticos, Prebióticos, Hematologia, Imunologia.

27 ABSTRACT

This work investigated the effect of different symbiotics on the feeding of the hybrid surubim (*Pseudoplatystomacorruscans* x *P. fasciatum*) after challenge with *Aeromonas hydrophila*. 336 fish were distributed in 24 tanks of 100 L capacity and fed for 20 days with unsupplemented diet, diet supplemented with *Weissella cibaria*, with inulin and *Lactobacillus plantarum* and only inulina prior to challenge. Twenty four hours after challenge, fish fed *W.cibaria* showed lower mortality than unsupplemented ones and those fed *L. Plantarum* (7.55 ± 3.78 , 31.48 ± 9.32 and $33.06\pm 7.94\%$ respectively). There was an increase in the numbers of erythrocyte, thrombocytes, leukocytes, linphocytes, special granulocytic cells and neutrophils in supplemented fish. It was also observed increased lysozyme and serum protein in supplemented fish compared to unsupplemented ones. Immunoglobulin concentration in fish fed with the simbiotic *W. cibaria* was higher than that observed in those fed *L. plantarum* (8.34 ± 0.19 mg.mL⁻¹ e 7.36 ± 0.95 mg.mL⁻¹). The effect of dietary supplementation with symbiotics in surubim did alter the hematological and immunological parameters. When analysing the survival after challenge with *A. hydrophila* fish fed *W. cibaria* which was isolated from surubim showed higher survival rate about 20% than fish fed *L. plantarum* isolated from tilapia.

KEY-WORDS: Experimental infection, Probiotics, Prebitics, Hematology, Immunology

28 INTRODUÇÃO

No desenvolvimento de estratégias para produção de peixes nativos brasileiros, destaca-se a nutrição em relação à saúde dos animais, a manutenção da capacidade imunitária e de resistir às enfermidades (Merrifield, Dimitroglou, Foey, Davies, Baker, Bogwald, Castex & Ringo 2010a)(Raniero, Aguas, Pereira, Fortunato, Ferreira & Martins 2004).

Uma das alternativas ao uso de quimioterápicos na aquicultura, onde seu uso indiscriminado gera diversos problemas já conhecidos, é a prevenção de enfermidades de origem bacteriana utilizando probióticos e prebióticos. Diversos trabalhos descrevem as alterações causadas por probióticos e prebióticos nos cultivos e sobre parâmetros hematológicos em peixes (Kim & Austin 2008, Balcazar, Vendrell, de Blas, Ruiz-Zarzuola & Muzquiz 2009, Newaj-Fyzul, Adesiyun, Mutani, Ramsubhag, Brunt & Austin 2007, Burr, Gatlin & Hume 2009, Burr, Hume, Ricke, Nisbet & Gatlin 2010, Grisdale-Helland, Helland & Gatlin 2008, Mahious, Gatesoupe, Hervi, Metailler & Ollevier 2006, Merrifield, Burnard, Bradley, Davies & Baker 2009).

De acordo com (Merrifield *et al.* 2010a), como todas as características desejadas na seleção de um micro-organismo probióticos são dificilmente alcançadas, pode-se tentar utilizar para ampliação dos efeitos esperados os prebióticos, que são substâncias não digeríveis que beneficiam o balanço entre as bactérias benéficas e as patogênicas no trato intestinal promovendo o balanço das bactérias probióticas, especificamente as bactérias ácido láticas, (Salomao, Brunialti, Martins, Fernandes, Silva, Rigato & Kallas 2004). Sendo assim, pode-se utilizar a incorporação conjunta do prebióticos e probióticos em dietas, denominando-as de dietas simbióticas (Patterson & Burkholder 2003).

Os parâmetros hematológicos são ferramentas de extrema importância para o monitoramento do estado de saúde animal. Muitos estudos em peixes tem sido avaliados relacionando o efeito de bactérias patogênicas sobre o estado de saúde do animal (Martins, Mouriño, Amaral, Vieira, Dotta, Bezerra, Pedrotti, Jerônimo, Buglione-Neto, & Pereira Jr. 2008, Martins, Vieira, Jerônimo, Mouriño, Dotta, Speck, Bezerra, Pedrotti, Buglione-Neto & Pereira Jr 2009, Ghosh & Homechaudhuri 2010, Yu, Han & Park 2010, Kumaran, Deivasigamani, Alagappan & Sakthivel 2010, Hosoki, Nakamura, Nagao, Hiraguchi, Tokuda, Wada, Nobori & Fujisawa 2010, Sharifuzzaman & Austin

2010, Skinner, La Patra, Adams, Thompson, Balfry, McKinley & Schulte 2010, Overturf, LaPatra, Towner, Campbell & Narum 2010, Harikrishnan, Balasundaram & Heo 2010).

Desta maneira, as pesquisas com peixes nativos envolvendo probióticos e/ou simbióticos constituem estratégia de combate a enfermidades de origem bacteriana como as causadas por *Aeromonas hydrophila* em surubim híbrido de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz 1829) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766).

O presente trabalho investigou o efeito da suplementação dietética com diferentes simbióticos, isolados de surubim híbridos de pintado e de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758), após desafio com *Aeromonas hydrophila* em surubins híbridos.

29 MATERIAL E MÉTODOS

29.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As cepas bacterianas probióticas utilizadas neste ensaio foram: *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) e *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01). *Weissella cibaria* foi isolada de híbridos de *Pseudoplatystoma* sp., sendo que *L. plantarum* foi isolada e reconhecida como probiótica para tilápias por Jatoba, Vieira, Neto, Silva, Mourino, Jeronimo, Dotta & Martins (2008). As cepas foram repicadas e incubadas à 35°C por 48 h em Caldo MRS (Difco®), para a manutenção da viabilidade. A cepa patogênica para híbridos de pintado e cachara, *A. hydrophila hydrophila* (CPQBA228-08 DRM) foi mantida e repicada em meio de cultura TSA a 30°C por 24 h até o preparo do inóculo para a infecção experimental em meio de cultura caldo BHI por mais 24 h à 30°C.

Foram utilizados 336 híbridos sadios entre pintados machos (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cacharas fêmeas (*Pseudoplatystoma fasciatum*) com aproximadamente 22,92±0,91 cm de comprimento e 69,26±5,94 g de peso, provenientes da Empresa Mar e Terra Ltda (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil).

29.2 PREPARO DA DIETA EXPERIMENTAL

Para a fabricação das dietas experimentais, a dieta comercial (Douramix®-Revolution Alevino-Tabela 13) foi previamente moída e adicionada a concentração de 0,5% de inulina (Orafti® HPX) e

realizada a homogeneização em misturador Y durante 15 minutos. Após homogeneizadas as misturas passaram por um processo de peletização e secagem por 18h a 45⁰C com circulação de ar. A dieta controle passou pelo mesmo processo de moagem, peletização e secagem, sem adição de inulina.

Tabela 12 - Níveis de garantia da dieta experimental utilizada Douramix[®]-Revolution Alevino.

| Composição informada | gr/kg de dieta |
|------------------------|----------------|
| Cálcio (máx.) | 35,0 |
| Extrato Etéreo (min.) | 120,0 |
| Fósforo (Min.) | 20,0 |
| Matéria Fibrosa (máx.) | 30,0 |
| Matéria Mineral (máx.) | 120,0 |
| Proteína Bruta (mín.) | 400,0 |
| Umidade (máx.) | 120,0 |

Sobre os peletes foi aspergido 200 mL·Kg⁻¹ da dieta do inoculo de cada cepa probiótica, em separado, possuindo uma concentração final de 10⁸ UFC·mL⁻¹. As dietas então foram secas em estufa com circulação de ar a 35⁰C por 18 h. Três amostras de 1g das diferentes dietas já contendo o inoculo foram maceradas com 1 mL de solução salina estéril a 0,65% e diluídas serialmente 9 vezes (1/10). As diluições 10⁻⁵ a 10⁻⁹ foram plaqueadas em meio de cultura Agar MRS (Difco[®]) a 35⁰C e incubadas por 48 horas. As contagens na ração suplementadas com os dois diferentes simbióticos permaneceram entorno de 10⁷ UFC·g⁻¹.

29.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 24 caixas circulares de 100L, com aeração e aquecimento constante (26°C) e sistema de filtração biológica com cascalho independente dos demais para assegurar a manutenção da qualidade da água, sendo efetuada diariamente a renovação de 30% e a retirada dos sedimentos do fundo dos tanques. Durante o período do experimento a qualidade da água foi a seguinte: pH 6,8±0,3, amônia total 1,1±0,6 mg.L⁻¹ e oxigênio dissolvido 8,7 mg.L⁻¹. Os peixes foram distribuídos em número de 14 animais por caixa, aclimatados por 5 dias antes de receberem as dietas experimentais. Após a aclimação, os peixes foram alimentados 4 vezes ao dia, durante 20 dias com as

seguintes dietas: sem suplementação, dieta suplementada com simbiótico (*W. cibaria* e inulina a 0,05%) e dieta suplementada com simbiótico (*L. plantarum* e inulina a 0,05%), quatro repetições por tratamento, e após os 20 dias de alimentação, quatro animais por unidade experimental foram anestesiados com benzocaína (1g.10L) para coleta de sanguínea e microbiológica do trato intestinal, constituindo os tratamentos basais. O restante dos animais foram alimentados por mais 5 dias para então serem inoculados e desafiados com cepa patogênica *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* e com solução salina tamponada com fosfato (PBS) como controle para o desafio, totalizando assim 9 tratamentos experimentais.

Para a infecção experimental, o inóculo de *A. hydrophila* recém crescido em BHI por 24h em 30°C, foi centrifugado por 30 minutos a 1800xg. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em solução PBS na proporção para que a suspensão se mantivesse em 2×10^8 UFC.mL⁻¹ segundo a curva de crescimento feita anteriormente por espectrofotometria.

Após 24 horas das injeções na proporção de 1mL das soluções para cada 100 gramas de peixe, mais quatro animais por caixa foram amostrados para as análises sanguíneas. Os animais que sobreviveram nas unidades experimentais, ou que já haviam morrido em 24 horas, constituíram a curva de mortalidade até 96 horas após infecção.

29.4 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Os tratos intestinais extirpados dos peixes foram retirados com o auxílio de pinças e bisturis para homogeneização em solução salina estéril em um graal para serem posteriormente diluídos serialmente (1/10) e semeados em meio de cultura Agar TSA (bactérias heterotróficas totais) e Agar MRS (bactérias ácido-láticas) e incubadas em estufa a 30°C. Após este período foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias após 24h da incubação no meio de cultura Agar TSA e 48h depois no Agar MRS. As colônias re-isoladas em MRS foram caracterizadas fenotipicamente pela coloração e formato de colônia, coloração de Gram e perfil bioquímico através do kit de identificação API 50HL (BioMérieux).

Para confirmação da infecção experimental pelo inóculo de *A. hydrophila* foram coletadas amostras do cérebro e coração de três animais por unidade experimental em *pool* para re-isolamento da bactéria patogênica em meio de cultura TSA. Os tecidos foram

macerados em gral de porcelana estéril na proporção de 1g de amostra para 1 mL de solução salina estéril a 0,65%. Posteriormente, todas as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo TSA, e incubadas a 30°C por 24 horas. Após este período, as colônias re-isoladas foram caracterizadas fenotipicamente pela coloração e formato de colônia, coloração de Gram e perfil bioquímico através do kit de identificação API 20E (BioMérieux).

29.5 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

As amostras sanguíneas foram colhidas por punção do vaso caudal com duas seringas de 3 mL (21G), uma contendo anticoagulante EDTA e outra sem anticoagulante. O sangue coletado com anticoagulante foi utilizado para realizar as análises hematológicas e como sangue sem anticoagulante foi realizado um pool por unidade experimental que permaneceu em repouso durante aproximadamente 1h a 25°C para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a 1400xg por 10 min para obtenção do soro sanguíneo e armazenamento a -20°C.

O sangue coletado com seringa contendo anticoagulante foi utilizado para confecção de duplicatas de extensões sanguíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald, para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb, Bowyer, Hall & Brosious 1971) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para quantificar o número total de eritrócitos em hemocítometro. Os números totais de trombócitos e leucócitos foram obtidos na extensão sanguínea pelo método indireto descrito por Buentello, Reyes-Becerril, Romero-Geraldo & Ascencio-Valle (2007). Alíquotas do soro foram utilizadas para determinação do índice glicêmico em espectrofotômetro, 505 nm de acordo com a recomendação pelo fabricante do kit glicose Biotécnica®.

A atividade da lisozima no soro sanguíneo foi determinada pela metodologia adaptada de Mauad, Vieira & dos Santos (2007), onde uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* ($0.50\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi diluída em solução tampão PBS (0.04 M Na_2HPO_4 , pH 6.2) imediatamente antes de sua utilização. Trinta microlitros do soro em triplicata do pool de peixes foi semeado em microplaca (96 micropoços com fundo chato) e 200 μL de suspensão de células de *M. lysodeikticus* adicionados em cada micropoço. A lisozima de clara de ovos da galinha (HEWL) foi utilizada para a curva padrão. Após incubar as microplacas por 20 minutos a 35°C, as absorvências iniciais e finais das amostras foram

medidas em 490nm e a taxa de redução na absorvência das amostras foi convertida para concentração de lisozima ($\mu\text{g/ml}$) determinada pela curva padrão.

A concentração de proteína total sérica dos peixes foi mensurada pela metodologia descrita por Bradford (1976) e a concentração de imunoglobina total sérica foi mensurada de acordo com o método descrito por Coelho, Bastos, Resende, Silva, Sanches, de Castro, Moretzsohn, Vieira & Trindade (2007), onde 100 μL do soro foi misturado com 100 μL de solução de polyethylene glycol (PEG, 10 000 MW, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) 12% e a mistura incubada por 2 horas para precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5000 g a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante retirado e mensurado a quantidade de proteína total por Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em mg.mL^{-1} , sendo calculada pela formula:

Total Ig (mg.ml^{-1}) = (proteína total do soro – proteína total tratada com PEG). Vol^{-1}

Os títulos de aglutinação foram feitos segundo o método descrito por Silva *et al.* (2009), para cepa de bactéria utilizada no experimento. A cepa de bactéria utilizada no desafio foi inoculada em BHI e incubada a 30°C durante 24 h, após a confirmação do crescimento das bactérias, as culturas foram acrescidas de formalina para que fique em uma concentração de 0,5% para serem então incubadas a 30°C durante 48 horas sob agitação contínua para inativação. Após este período, o inóculo bacteriano foi centrifugado a 1800g por 30 minutos. O sobrenadante, contendo a formalina, foi descartado e o *pellet* ressuspense em PBS. Para confirmação da inocuidade do processo, 300 μL das culturas ressuspensas foram semeadas em meio de cultura TSA e incubadas a 30°C por 72 horas. Não havendo crescimento de colônias, as suspensões bacterianas foram ajustadas para uma concentração de 0.4 em um comprimento de onda de 505 nm para serem utilizadas nas análises.

O título da atividade aglutinante sérica foi feito em microplaca de 96 poços de fundo U, onde o soro diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS, 0.04M de fosfato monobásico, 0.16M de fosfato dibásico, 0.11M de cloreto de sódio, pH 7.2) no 1° poço (50 μL de solução PBS:50 μL do soro), sendo diluído serialmente em fator 1:2 para os demais poços até o 12°. Depois disso, foram adicionados 50 μL da ~~cepa~~ ^{cepa} inativada em todos os poços. A microplaca foi incubada a 25°C durante 18 horas em câmara úmida. A

aglutinação foi confirmada com a observação de um *bottom* no fundo do poço a olho nu. O título aglutinante foi considerado como o recíproco da última diluição que apresentou aglutinação.

A atividade antimicrobiana foi realizada em microplaca de 96 poços com fundo chato, segundo metodologia adaptada de Silva *et al.* (2009). O soro dos peixes foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana contra a bactéria utilizada no desafio experimental, cultivada em BHI a 30°C. Após 24 h a bactéria foi preparada na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluída em meio de cultura *Poorbroth* (PB) 100.000 vezes. O soro foi filtrado em filtro milipore 22 µm para eliminação de possível contaminação bacteriana. Então, 150 µL de PB foi adicionado no 1° poço da linha e 100 µL nos demais poços, e 50 µL do soro adicionado ao primeiro poço da linha. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada fator 1:2 até o 12° poço. Para controle positivo e branco, a solução salina estéril foi diluída em PB, da mesma forma do que para o soro. Finalmente, 20 µL da bactéria foi adicionado em cada poço da amostra diluída do soro e do controle positivo. A microplaca foi então incubada à 30°C por 12 horas sob agitação orbital e o crescimento dos micro-organismos determinado em leitora de microplaca no comprimento de onda de 550 nm. A atividade antimicrobiana do soro é recíproca da última diluição que apresentou atividade bactericida ou bacteriostática.

29.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos tratamentos basais foram analisados separados do desafio (peixes injetados com PBS ou *Aeromonas hydrophila*). Os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variância pelo teste Bartlett e observado heterogeneidade de variâncias os dados foram transformados para $\log_{10}(x+1)$ (para os dados de contagens microbiológicas e hemogramas). Os dados de aglutinação e antimicrobianos foram transformados em $\log_2(x+1)$ antes de serem analisados. Os dados foram avaliados por análise de variância fatorial (3x2) com nível de significância de 5%, onde fator 1 era as diferentes suplementações e o fator 2 o desafio com PBS ou *A. hydrophila*. Caso detectado diferença significativa na análise de variância, foi realizado o teste Tukey de separação de médias ($\alpha < 0,05$) (Knussmann 1984).

30 RESULTADOS

30.1 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

As concentrações bacterianas no intestino dos peixes suplementados com dietas simbióticas contendo *W. cibaria* e *L. plantarum*, em meio de cultura seletivo para bactérias ácido lácticas, apresentaram valores superiores ao grupo controle sendo $4,67 \pm 0,85$; $3,15 \pm 0,44$ e $0,35 \pm 0,25$ Log UFC.g⁻¹ de intestino, respectivamente. As colônias bacterianas isoladas do trato intestinal dos peixes suplementados com as bactérias ácido lácticas foram caracterizadas morfológicamente como bastonetes Gram positivos e com 99,8% de similaridade com o perfil bioquímico tanto para a cepa de *W. cibaria* como para a cepa de *L. plantarum*. Estes resultados influenciaram as contagens de bactérias heterotróficas totais presentes no trato intestinal dos animais, aumentando a concentração das mesmas nos grupos suplementados com *W. cibaria* e *L. plantarum* em relação ao grupo controle, as quais foram de $6,50 \pm 0,05$; $7,01 \pm 0,44$ e $4,31 \pm 0,44$ Log UFC.g⁻¹ respectivamente (Tabela 14).

Tabela 13 - Contagens bacterianas (Log UFC.gr⁻¹) do trato intestinal de surubins alimentados com dieta controle sem suplementação, dieta contendo *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+0,5% de inulina e dieta contendo *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01) + 0,5% de inulina. Médias±desvio padrão seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

| Tratamento | Bactérias totais | Ácido lácticas |
|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| Dieta controle | $4,31 \pm 0,44^a$ | $0,35 \pm 0,25^a$ |
| <i>Weissella cibaria</i> | $6,50 \pm 0,05^{ab}$ | $4,67 \pm 0,85^b$ |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | $7,01 \pm 0,44^b$ | $3,15 \pm 0,44^b$ |

Médias±desvio-padrão seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05)

Após 24 horas do desafio experimental com *A. hydrophila*, houve alto índice de mortalidade em todos os tratamentos, porém os animais tratados com *W. cibaria* e 0,5% de inulina apresentaram mortalidade significativamente inferior do que os animais do grupo não suplementado e suplementado com o *L. plantarum* e 0,5% de inulina ($7,55 \pm 3,78$; $31,48 \pm 9,32$ e $33,06 \pm 7,94$ % respectivamente). Este quadro de mortalidade se manteve constante durante as 96 horas avaliadas (Figura 4).

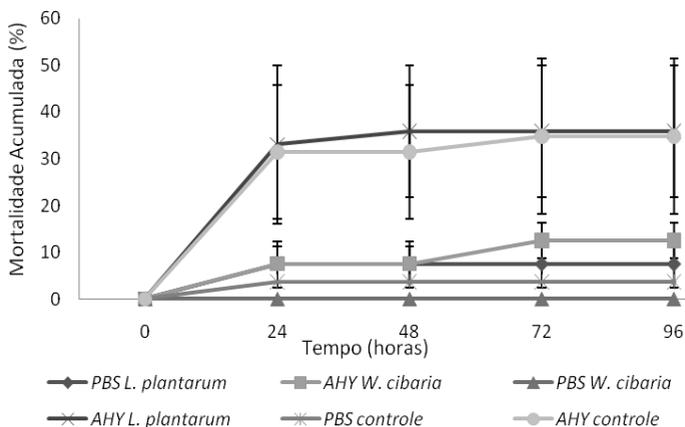


Figura 4 - Mortalidade acumulada até 96 horas após desafio experimental em híbrido de *Pseudoplatystoma* alimentados com *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) + 0,5% de inulina; com *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+0,5% de inulina e sem suplementação dietética (controle), inoculados com solução tampão estéril (PBS) e *Aeromonas hydrophila*(AHY). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

30.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

Os animais referenciados como basais e alimentados com as dietas simbióticas, não apresentaram diferenças significativas em todas os parâmetros hematológicos quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, quando submetidos à injeção intraperitoneal contendo PBS e/ou *A. hydrophila* observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) nos números de eritrócitos, trombócitos, leucócitos, linfócito, células granulocíticas especiais e neutrófilos (Tabela 3).

Também na Tabela 3, as contagens de eritrócitos nos animais tratados com simbióticos e inoculados com *A. hydrophila* se mantiveram superiores ($P < 0,05$) aos demais submetidos à ambos estresses, seja por solução tampão ou mesmo *A. hydrophila*. Porém, quando avaliada a contagem total de trombócitos sanguíneos em relação ao desafio nos diferentes tratamentos, não houve diferença significativa entre os

desafiados com solução tampão eos inoculados com *A. hydrophila*, somente houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os diferentes tipos de suplementação dietética.

A contagens total de leucócitos dos animais suplementados com o simbiótico à base de *W. cibaria* e desafiados com *A. hydrophila* foi maior do que os demais desafiados, $28,21\pm 2,16 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$, $25,14\pm 2,17 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ e $17,95\pm 1,50 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ para o simbiótico com *W. cibaria*, *L. plantarum* e grupo controle, respectivamente. Já nas contagens diferenciais de leucócitos, o número de linfócitos diminuiu ($P<0,05$) nos animais inoculados com *A. hydrophila* em relação aos inoculados com PBS.

Nas contagens de monócitos circulantes observou-se que os peixes inoculados com PBS apresentaram valores médios inferiores aos injetados com *A. hydrophila* ($P<0,05$). Mesmo não havendo interação entre os desafios e os tratamentos, estes diferiram significativamente entre si ($P<0,05$). O grupo tratado com *W. cibaria* desafiado com *A. hydrophila* apresentaram a maior contagem celular de monócitos de $7,97\pm 0,99 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$.

A maior média no número de neutrófilos ocorreu nos animais injetados com *A. hydrophila* suplementados com o simbiótico contendo *W. cibaria* ($P<0,05$) quando comparado aos demais (Tabela 3).

Ao avaliar os parâmetros imunológicos em surubins alimentados com a dieta simbiótica acrescida de *W. cibaria* em relação às dietas contendo *L. plantarum* e dieta controle sem suplementação, foi observado aumento na atividade sérica da lisozima nos tratamentos basais significativamente diferentes ($11,70\pm 0,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $9,46\pm 1,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $7,06\pm 1,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Os níveis de proteína sérica dos animais suplementados com os simbióticos foram superiores aos do grupo controle ($P<0,05$) (Tabela 4). No entanto, os demais parâmetros como a glicose, imunoglobulina total, atividade antimicrobiana e aglutinante sérica não foi possível detectar diferenças significativas sob condições basais. Somente foi possível detectá-las sob condições de estresse devido às inoculações de solução tampão PBS e *A. hydrophila*.

Após 24 horas da inoculação de PBS e *A. hydrophila* foi observado que a atividade antimicrobiana e as concentrações de imunoglobulinas totais séricas dos animais inoculados com a bactéria patogênica foram aumentadas significativamente ($P<0,05$). As concentrações de imunoglobulinas totais séricas dos peixes alimentados com simbiótico contendo *W. cibaria* foram maiores do que os

alimentados com *L. plantarum* ($8,34 \pm 0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $7,36 \pm 0,95 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente).

Tabela 14- Parâmetros hematológicos de surubins híbridos alimentados com dieta controle sem suplementação, dieta contendo *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+0,5% de inulina e dieta contendo *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+0,5% de inulina), inoculados com solução tampão (PBS), *Aeromonas hydrophila* (AHY) e sem inoculação (BASAL). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$).

| Tratamentos | Eritrócitos $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ | Hematócrito % | Trombócitos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ | Leucócitos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ |
|-----------------------------|---|------------------------------|---|--|
| Controle (BASAL) | 1,89 \pm 0,20 ^{a*} | 22,20 \pm 2,5 ^a | 26,01 \pm 7,32 ^a | 35,71 \pm 6,19 ^a |
| <i>W. cibaria</i> (BASAL) | 1,89 \pm 0,10 ^a | 22,82 \pm 2,4 ^a | 27,57 \pm 2,99 ^a | 32,40 \pm 6,78 ^a |
| <i>L. plantarum</i> (BASAL) | 1,93 \pm 0,18 ^a | 22,47 \pm 1,6 ^a | 26,84 \pm 2,57 ^a | 31,65 \pm 5,51 ^a |
| Controle (PBS) | 1,65 \pm 0,20 ^{ab} | 23,97 \pm 1,1 ^a | 19,73 \pm 5,43 ^{a,A} | 21,57 \pm 5,17 ^{ab} |
| <i>W. cibaria</i> (PBS) | 1,76 \pm 0,14 ^{ab} | 21,93 \pm 1,0 ^a | 22,57 \pm 4,52 ^{a,AB} | 17,12 \pm 3,38 ^{ab} |
| <i>L. plantarum</i> (PBS) | 1,85 \pm 0,05 ^{ab} | 23,17 \pm 2,0 ^a | 33,97 \pm 1,73 ^{a,B} | 26,46 \pm 3,12 ^{ab} |
| Controle (AHY) | 1,42 \pm 0,09 ^b | 17,58 \pm 1,3 ^a | 15,64 \pm 2,29 ^{a,A} | 17,95 \pm 1,50 ^a |
| <i>W. cibaria</i> (AHY) | 1,99 \pm 0,18 ^a | 22,51 \pm 2,2 ^a | 25,03 \pm 4,88 ^{a,AB} | 28,21 \pm 2,16 ^b |
| <i>L. plantarum</i> (AHY) | 2,00 \pm 0,08 ^a | 21,83 \pm 0,8 ^a | 27,62 \pm 4,40 ^{ab,B} | 25,14 \pm 2,17 ^{ab} |

* Letras minúsculas: Diferença de médias entre fator suplementação (Controle, *W. cibaria* e *L. plantarum*). Letras maiúsculas: Diferença de médias entre fator desafio (PBS e *Aeromonas hydrophila*).

Tabela 15- Contagem diferencial de leucócitos de surubins híbridos alimentados com dieta controle sem suplementação, dieta contendo *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02)+0,5% de inulina e dieta contendo *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+0,5% de inulina), inoculados com solução tampão (PBS), *Aeromonas hydrophila* (AHY) e sem inoculação (BASAL). Médias \pm desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05). CGE: célula granulocítica especial

| Tratamentos | x10 ³ μ L ⁻¹ | | | | | CGE | Neutrófilos |
|-----------------------------|--|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------|
| | Linfócitos | Monócitos | Eosmófilos | Basófilos | CGE | | |
| Controle (BASAL) | 25,24 \pm 3,79 ^a | 1,34 \pm 0,39 ^a | 0,24 \pm 0,17 ^a | 1,69 \pm 0,92 ^a | 0,87 \pm 0,48 ^a | 6,31 \pm 1,40 ^a | |
| <i>W. cibaria</i> (BASAL) | 24,16 \pm 4,74 ^a | 1,28 \pm 0,54 ^a | 0,32 \pm 0,20 ^a | 1,25 \pm 0,25 ^a | 0,87 \pm 0,34 ^a | 4,53 \pm 1,25 ^a | |
| <i>L. plantarum</i> (BASAL) | 22,88 \pm 3,56 ^a | 1,54 \pm 0,68 ^a | 0,10 \pm 0,09 ^a | 0,85 \pm 0,28 ^a | 1,46 \pm 0,85 ^a | 4,81 \pm 2,00 ^a | |
| Controle (PBS) | 12,56 \pm 3,49 ^{a,A} | 2,43 \pm 0,85 ^{a,A} | 0,06 \pm 0,06 ^a | 0,53 \pm 0,17 ^a | 2,88 \pm 1,44 ^{a,A} | 3,10 \pm 0,66 ^a | |
| <i>W. cibaria</i> (PBS) | 7,10 \pm 2,37 ^{a,A} | 4,05 \pm 0,12 ^{b,A} | 0 ^a | 0,74 \pm 0,41 ^a | 3,67 \pm 0,03 ^{a,AB} | 1,55 \pm 0,69 ^a | |
| <i>L. plantarum</i> (PBS) | 12,33 \pm 1,18 ^{a,A} | 3,26 \pm 0,70 ^{ab,A} | 0 ^a | 0,98 \pm 0,34 ^a | 5,97 \pm 1,18 ^{a,B} | 3,91 \pm 0,29 ^{ab} | |
| Controle (AHY) | 6,91 \pm 1,18 ^{ab,B} | 6,29 \pm 0,60 ^{a,B} | 0,01 \pm 0,01 ^a | 0,66 \pm 0,15 ^a | 2,62 \pm 0,87 ^{a,A} | 1,48 \pm 0,44 ^a | |
| <i>W. cibaria</i> (AHY) | 8,61 \pm 0,87 ^{ab,B} | 7,97 \pm 0,99 ^{b,B} | 0,06 \pm 0,05 ^a | 0,83 \pm 0,14 ^a | 4,39 \pm 1,44 ^{a,AB} | 6,35 \pm 1,06 ^b | |
| <i>L. plantarum</i> (AHY) | 7,44 \pm 1,59 ^{ab,B} | 7,04 \pm 0,70 ^{ab,B} | 0,07 \pm 0,07 ^a | 0,86 \pm 0,26 ^a | 5,38 \pm 2,04 ^{ab,B} | 4,34 \pm 1,44 ^{ab} | |

Letras minúsculas: Diferença de médias entre fator suplementação (Controle, *W. cibaria* e *L. plantarum*).
 Letras maiúsculas: Diferença de médias entre fator desafio (PBS e *Aeromonas hydrophila*).

Tabela 16 - Parâmetros imunológicos em surubins híbridos alimentados com dieta suplementada com *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02+com 0,5% de inulina, com *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01)+com 0,5% de inulina e sem suplementação, inoculados com solução tampão estéril (PBS), *Aeromonas hydrophila* (AHY) e sem inoculação (BASAL). Médias±desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

| Tratamentos | Glicose (mg dL ⁻¹) | Proteína (mg.mL ⁻¹) | Ig total (mg.mL ⁻¹) | Lisozima (µg.mL ⁻¹) | Atividade sérica | | |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| | | | | | Antimicrobiana Log ₂ (x+1) | Antimicrobiana Log ₂ (x+1) | Aglutinante Log ₂ (x+1) |
| Controle (BASAL) | 45,56±5,21 ^a | 18,71±0,81 ^a | 1,05±0,86 ^a | 7,06±1,80 ^a | 1,44±0,22 ^a | 1,44±0,22 ^a | 7,42±0,57 ^a |
| <i>W. cibaria</i> (BASAL) | 48,66±6,18 ^a | 24,02±0,99 ^b | 1,45±0,30 ^a | 11,70±0,40 ^b | 1,95±0,33 ^a | 1,95±0,33 ^a | 8,00±0,57 ^a |
| <i>L.plantarum</i> (BASAL) | 48,24±5,34 ^a | 23,49±0,61 ^b | 1,71±0,78 ^a | 9,46±1,16 ^{ab} | 1,83±0,37 ^a | 1,83±0,37 ^a | 7,33±0,48 ^a |
| Controle (PBS) | 65,26±4,01 ^a | 22,65±2,90 ^a | 0,93±0,52 ^a | 14,37±1,16 ^a | 2,07±0,33 ^{ab,A} | 2,07±0,33 ^{ab,A} | 8,00±0,57 ^a |
| <i>W. cibaria</i> (PBS) | 57,71±10,80 ^a | 20,91±1,83 ^a | 1,69±0,43 ^a | 13,98±1,32 ^a | 1,92±0,83 ^{ab,A} | 1,92±0,83 ^{ab,A} | 8,17±0,57 ^a |
| <i>L.plantarum</i> (PBS) | 61,40±14,70 ^a | 18,51±3,75 ^a | 3,67±1,05 ^{ab} | 12,43±1,73 ^a | 1,38±0,26 ^{ab,A} | 1,38±0,26 ^{ab,A} | 7,59±0,64 ^a |
| Controle (AHY) | 38,65±1,41 ^a | 18,27±1,23 ^a | 4,49±1,14 ^{ab} | 12,79±0,29 ^a | 3,39±0,34 ^{ab,B} | 3,39±0,34 ^{ab,B} | 8,41±0,57 ^a |
| <i>W. cibaria</i> (AHY) | 41,11±12,05 ^a | 19,43±0,55 ^a | 8,34±0,19 ^c | 11,83±0,71 ^a | 4,32±0,37 ^{ab,B} | 4,32±0,37 ^{ab,B} | 8,17±0,57 ^a |
| <i>L.plantarum</i> (AHY) | 31,44±9,96 ^a | 20,59±0,55 ^a | 7,36±0,95 ^{bc} | 13,21±2,07 ^a | 3,78±0,41 ^{ab,B} | 3,78±0,41 ^{ab,B} | 7,75±0,48 ^a |

Letras minúsculas: Diferença de médias entre fator suplementação (Controle, *W. cibaria* e *L. plantarum*).
Letras maiúsculas: Diferença de médias entre fator desafio (PBS e *Aeromonas hydrophila*).

31 DISCUSSÃO

31.1 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

A colonização da superfície da mucosa intestinal dos peixes por uma microbiota saudável possui efeito positivo sobre o sistema imune intestinal, sendo que a perturbação dessas funções pode causar desequilíbrio na microbiota podendo contribuir para o desenvolvimento de enfermidades (Sun, Yang, Ma & Lin 2010, Whyte 2007, Watts, Munday & Burke 2001, Merrifield *et al.* 2010a)

A colonização do trato intestinal é fator decisório no desenvolvimento de probióticos. As bactérias ácido-láticas, um dos principais atores deste mecanismo, possuem esta capacidade, fato comprovado neste trabalho em ambos os tratamentos suplementados. Mesmo não havendo diferença significativa entre os grupos suplementados com as bactérias isoladas dos peixes nativos, *Weissella cibaria* em comparação à bactérias isoladas de tilápias (*Oreochromis niloticus*), *Lactobacillus plantarum*, a diferença foi evidente quando comparado aos animais não suplementados (Balcazar, Vendrell, de Blas, Ruiz-Zarzuela, Muzquiz & Girones 2008, Gatesoupe 2008, Merrifield, Harper, Dimitroglou, Ringo & Davies 2010b).

Na revisão de Abelli, Randelli, Carnevali & Picchiatti (2009), o envolvimento dos probióticos na nutrição e/ou resistência à enfermidades está relacionado à modulação imunitária, existindo relação entre hospedeiro e cepas específicas provenientes do próprio animal, diferenciando assim os modos de atuação de cada cepa. Após o desafio experimental, os animais tratados com *W. cibaria* provenientes de surubins híbridos apresentaram índices de mortalidade significativamente inferiores aos animais não suplementados e suplementados com o *L. plantarum* isolado de tilápias.

Diversos trabalhos avaliaram o efeito positivo da suplementação dietética de probióticos sobre a resistência à infecções bacterianas (Vendrell, Balcazar, de Blas, Ruiz-Zarzuela, Girones & Muzquiz 2008) descreveram a utilização de *Leuconostoc mesenteroides* e *L. plantarum* em truta arco-íris desafiadas com *Lactococcus garvieae*; (Son, Chang, Wu, Guu, Chiu & Cheng 2009), avaliaram a suplementação de *Epinephelus coioides* Hamilton 1822 com *L. plantarum* contra *Streptococcus*. Segundo Merrifield *et al.* (2010a), poucos avaliaram a utilização conjunta de probióticos e prebióticos sob condições de infecção experimental ou que tenham comparado esta utilização com micro-organismos isolados do próprio animal em estudo.

31.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

Os peixes suplementados com *W. cibaria* apresentaram maior número total de eritrócitos, trombócitos, leucócitos, células granulocíticas especiais e imunoglobulina total quando comparado com os não suplementados injetados com *A. hydrophila*. Trutas arco-íris suplementadas com a bactéria *Kocuria* SM1 isoladas do próprio animal durante 2 semanas apresentaram redução de 20% de mortalidade (Sharifuzzaman & Austin 2009 e 2010). Os autores observaram aumento também no número de leucócitos, eritrócitos e imunoglobulinas totais após injeção i.p. com *V. anguillarum* e *V. ordalli*, corroborando o presente resultado. O aumento no número de trombócitos na circulação em animais suplementados tanto com *W. cibaria* como *L. plantarum* comprova a atuação deste tipo celular na defesa do organismo conforme verificado por Martins et al. (2008, 2009) e Bozzo et al. (2007).

Como as respostas do sistema imune em peixes consistem na interação de diferentes órgãos e tipos de células, pressupõe-se que esta interação de antígenos com as células induzem as respostas celulares mediadas por anticorpos, resultando na resposta imune sistemática mediada pelo Ig. O aumento no número de leucócitos é uma estratégia para a migração dos mesmos aos sítios de infecção com o intuito de aumentar a taxa de fagocitose e a atividade antimicrobiana frente à infecção (Secombes, Hardie & Daniels 1996, Peddie, Zou, Cunningham & Secombes 2001, Secombes, Wang, Hong, Peddie, Crampe, Laing, Cunningham & Zou 2001, Secombes, Bird, Hong, Laing & Zou 2001, Nayak 2010, Picchietti, Fausto, Randelli, Carnevali, Taddei, Buonocore, Scapigliati & Abelli 2009, Abelli et al. 2009).

Quando comparados os efeitos da suplementação de *W. cibaria* em relação a *L. plantarum* nos peixes, além da diminuição do índice de mortalidade após o desafio, observou-se aumento significativo no número de neutrófilos e de leucócitos totais. Os peixes suplementados com *W. cibaria* desafiados apresentaram maior número total de leucócitos em relação aos animais controle desafiados. Estes resultados mostram que a dieta contendo simbiótico melhorou a resposta de defesa dos peixes quando em situação de infecção bacteriana. O aumento no número de neutrófilos pode estar relacionado à fagocitose por estas células, uma das principais células envolvidas no mecanismo de defesa à bactérias patogênicas como as *Aeromonas* (Ellis 2001). Os neutrófilos podem além de fagocitar as bactérias invasoras e destruí-las pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o “burst”

respiratório, conter lisozima e enzimas hidrolíticas em seus lisossomos, potentes agentes bactericidas (Secombes *et al.* 1996, Bandyopadhyay & Mohapatra 2009, Balcazaret *al.* 2009).

Contrariamente ao observado por Martins *et al.* (2008) em tilápia injetada com *Enterococcus* intraperitonealmente, no presente estudo os animais suplementados com *W. cibaria* apresentaram aumento no número de monócitos circulantes, tanto em relação aos basais como os animais controle injetados com *A. hydrophila*. A menor presença destas células, segundo (Martins *et al.* 2008) está relacionada à migração ao sítio lesado. Porém, a monócitose que ocorreu neste estudo parece estar associada a suplementação dietética, melhorando a população destas células, as quais em algum momento se diferenciarão em macrófagos em locais de infecção (Martins *et al.* (2009).

A proteção contra *A. hydrophila* nos peixes suplementados com *W. cibaria* pode estar associada também ao aumento do número de anticorpos presentes no soro sanguíneo estimulado pela presença das bactérias probióticas (Kumar, Mukherjee, Prasad & Pal 2006)(Ringo, Lovmo, Kristiansen, Bakken, Salinas, Myklebust, Olsen & Mayhew 2010).

A melhora na competência imunitária causado pela adição dos probióticos pode ser observado quando comparou-se os animais injetados tanto com solução PBS como com *A. hydrophila* em relação aos grupos basais, pois quando não havia a presença do agente estressor a suplementação com os simbióticos não alterou os parâmetros hematológicos, mas aumentou os índices de proteína e lisozima sérica corroborando as observações de Das, Pradhan & Sahu (2009), Son *et al.* (2009), Sharifuzzaman & Austin (2010) e de Eyto, McGinnity, Consuegra, Coughlan, Tufto, Farrell, Megens, Jordan, Cross & Stet (2007).

32 CONCLUSÃO

O efeito da suplementação dietética de simbióticos aumentou a competência imunitária em surubins híbridos, aumentando as contagens de eritrócitos, trombócitos, leucócitos totais, células granulocíticas especiais, neutrófilos, atividade da lisozima e imunoglobulinas totais. A suplementação com *W. cibaria*, isolada de surubins, aumentou a sobrevivência dos animais em cerca de 20% quando comparado à cepa de *L. plantarum* proveniente de tilápias após desafio com *Aeromonas hydrophila* subespécie *hydrophila*. Este estudo evidencia que a suplementação com simbiótico melhora significativamente a resposta de

defesa em peixes em situação de infecção bacteriana, podendo ser utilizado para minimizar as perdas no cultivo decorrentes de enfermidades.

33 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (577657/08-9;301072/08-9) pelo apoio financeiro e bolsa de Produtividade em Pesquisa a M.L. Martins, à Empresa Mar & Terra por financiar parte dos estudos e ceder os animais, à Fapesc por conceder bolsas de mérito estudantil aos alunos de graduação envolvidos e à rede AQUABRASIL-EMBRAPA, pelo auxílio a projetos de patologia vinculados ao desenvolvimento da piscicultura na região do Mato Grosso do Sul

34 REFERÊNCIAS

Abelli L., Randelli E., Carnevali O. & Picchiatti S. (2009) Stimulation of Gut Immune System by Early Administration of Probiotic Strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* **1163**, 340-342.

Balcazar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I. & Muzquiz J.L. (2009) Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in Brown Trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **17**, 153-157.

Balcazar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Muzquiz J.L. & Girones O. (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* **278**, 188-191.

Bandyopadhyay P. & Mohapatra P.K.D. (2009) Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of Catla catla (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry* **35**, 467-478.

Bradford, M.M. & Williams, W.L. (1976) New, Rapid, Sensitive Method for Protein Determination. *Fed. Proc.*, **35**, 274-274.

- Bozzo F.R., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R., Pereira, G.T., Tavares-Dias, M. & Onaka, E.M. (2007) Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *Journal of the World Aquaculture Society* **38**, 302-308.
- Buentello J.A., Reyes-Becerril M., Romero-Geraldo, M.D. & Ascencio-Valle, F.D. (2007) Effects of dietary arginine on hematological parameters and innate immune function of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* **19**, 195-203.
- Burr G., Gatlin D.M. & Hume M. (2009) Effects of the Prebiotics GroBiotic((R))-A and Inulin on the Intestinal Microbiota of Red Drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **40**, 440-449.
- Burr G., Hume M., Ricke S., Nisbet D. & Gatlin D. (2010) In vitro and in vivo evaluation of the prebiotics grobioticA (R)-A, inulin, mannanoligosaccharide, and galactooligosaccharide on the digestive microbiota and performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Microbial Ecology* **59**, 187-198.
- Coelho L.G.V., Bastos E.M.A.F., Resende C.C., Silva C.M.P.E., Sanches B.S.F., De Castro F.J., Moretzsohn L.D., Vieira W.L.D.S. & Trindade O.R. (2007) Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. A pilot clinical study. *Helicobacter* **12**, 572-574.
- Das B.K., Pradhan J. & Sahu S. (2009) The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology* **26**, 871-876.
- De Eyto E., McGinnity P., Consuegra S., Coughlan J., Tufto J., Farrell K., Megens H.J., Jordan W., Cross T. & Stet R.J.M. (2007) Natural selection acts on Atlantic salmon major histocompatibility (MH) variability in the wild. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 861-869.
- Ellis A.E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 827-839.

Gatesoupe F.J. (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **14**, 107-114.

Ghosh R. & Homechaudhuri S. (2010) Analysis of selected blood parameters in the tropical freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) following artificial inoculation of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *Indian Journal of Fisheries* **57**, 77-83.

Goldenfarb P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. & Brosious, E. (1971) Reproducibility in Hematology Laboratory - Microhematocrit Determination. *American Journal of Clinical Pathology* **56**, 35-9.

Grisdale-Helland B., Helland S.J. & Gatlin D.M. (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **283**, 163-167.

Harikrishnan R., Balasundaram C. & Heo M.S. (2010) Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **28**, 354-361.

Hosoki K., Nakamura A., Nagao M., Hiraguchi Y., Tokuda R., Wada H., Nobori T. & Fujisawa T. (2010) Differential activation of eosinophils by 'probiotic' *Bifidobacterium bifidum* and 'pathogenic' *Clostridium difficile*. *International Archives of Allergy and Immunology* **152**, 83-89.

Jatoba A., Vieira F.D., Neto C.B., Silva B.C., Mourino J.L.P., Jeronimo G.T., Dotta G. & Martins M.L. (2008) Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **43**, 1201-1207.

Kim D.H. & Austin B. (2008) Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letters in Applied Microbiology* **47**, 141-147.

Knussmann R. (1984) *The Basis for Biological Statistics*. 8th Edition - German - Weber, E. *Homo* **34**, 121-121.

- Kumar R., Mukherjee S.C., Prasad K.P. & Pal A.K. (2006) Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research* **37**, 1215-1221.
- Kumaran S., Deivasigamani B., Alagappan K.M. & Sakthivel M. (2010) Infection and immunization trials of Asian seabass (*Lates calcarifer*) against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Environmental Biology* **31**, 539-541.
- Li P., Ray B., Gatlin D.M., Sink T., Chen R.G. & Lochmann R. (2009) Effect of handling and transport on cortisol response and nutrient mobilization of golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*. *Journal of the World Aquaculture Society* **40**, 803-809.
- Mahious A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R. & Ollevier F. (2006) Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International* **14**, 219-229.
- Martins M.L., Mouriño J.L.P., Amaral G.V., Vieira F.N., Dotta G., Bezerra A.J.M., Pedrotti F.S., Jerônimo G.T., Buglione-Neto C.C. & Pereira-Jr. G. (2008) Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 631-637.
- Martins M.L., Myiazaki D.M.Y., Tavares-Dias M., Fenerick Jr. J., Onaka E.M., Bozzo F.R., Fujimoto R.Y. & Moraes F.R. (2009) Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). *Brazilian Journal of Biology* **69**, 631-637.
- Mauad M.D.M.E., Vieira M.N.C.M. & Dos Santos C.B. (2007) Food Grant ProGram - the case of Ribeirao Preto-SP 2002-2003. *Annals of Nutrition and Metabolism* **51**, 312-312.
- Merrifield D.L., Burnard D., Bradley G., Davies S.J. & Baker R.T.M. (2009) Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* **40**, 1064-1072.

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bogwald J., Castex M. & Ringo E. (2010a) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* **302**, 1-18.

Merrifield D.L., Harper G.M., Dimitroglou A., Ringo E. & Davies S.J. (2010b) Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research* **41**, 1268-1272.

Nayak S.K. (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* **29**, 2-14.

Newaj-Fyzul A., Adesiyun A.A., Mutani A., Ramsubhag A., Brunt J. & Austin B. (2007) *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1699-1706.

Overturf K., Lapatra S., Towner R., Campbell N. & Narum S. (2010) Relationships between growth and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **33**, 321-329.

Patterson J.A. & Burkholder K.M. (2003) Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science* **82**, 627-631.

Peddie S., Zou J., Cunningham C. & Secombes C.J. (2001) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β and derived peptides induce migration of head-kidney leucocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol* **11**, 697-709.

Picchiatti S., Fausto A.M., Randelli E., Carnevali O., Taddei A.R., Buonocore F., Scapigliati G. & Abelli L. (2009) Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish & Shellfish Immunology* **26**, 368-376.

Raniero L., Aguas H., Pereira L., Fortunato E., Ferreira I. & Martins R. (2004) Batch processing method to deposit a-Si : H films by PECVD. *Advanced Materials Forum II*, **455/456**, 104-107.

Ringo E., Lovmo L., Kristiansen M., Bakken Y., Salinas I., Myklebust R., Olsen R.E. & Mayhew T.M. (2010) Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* **41**, 451-467.

Salomao R., Brunialti M.K., Martins P.S., Fernandes M.L., Silva E., Rigato O. & Kallas E.G. (2004) Effect of recombinant human activated protein C (Drotrecogin Alfa Activated - DAA) in the inflammatory response of monocytes and neutrophils in whole blood of healthy volunteers (HV). *Shock* **21**, 54-55.

Secombes C.J., Bird S., Hong S., Laing K.J. & Zou J. (2001) Phylogeny of vertebrate cytokines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **484**, 89-94.

Secombes C.J., Hardie L.J. & Daniels G. (1996) Cytokines in fish: An update. *Fish & Shellfish Immunology* **6**, 291-304.

Secombes C.J., Wang T., Hong S., Peddie S., Crampe M., Laing K.J., Cunningham C. & Zou J. (2001) Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 713-723.

Sharifuzzaman S.M. & Austin B. (2010) *Kocuria* SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **108**, 2162-2170.

Sharifuzzaman, S.M. & Austin, B. (2009) Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 27, 440-445.

Silva B.C., Martins M.L., Jatoba A., Buglione C.C., Vieira F.N., Pereira G.V., Jeronimo G.T., Mourino J.L.P. (2009) Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 874-880.

Skinner L.A., Lapatra S.E., Adams A., Thompson K.D., Balfry S.K., Mckinley R.S. & Schulte P.M. (2010) Supra-physiological levels of cortisol suppress lysozyme but not the antibody response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following vaccine injection. *Aquaculture* **300**, 223-230.

- Son V.M., Chang C.C., Wu M.C., Guu Y.K., Chiu C.H. & Cheng W.T. (2009) Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **26**, 691-698.
- Sun Y.Z., Yang H.L., Ma R.L. & Lin W.Y. (2010) Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **29**, 803-809.
- Vendrell D., Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Girones O. & Muzquiz J.L. (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **31**, 337-345.
- Watts M., Munday B.L. & Burke C.M. (2001) Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* **79**, 570-574.
- Whyte S.K. (2007) The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 1127-1151.
- Yu J.H., Han J.J. & Park S.W. (2010) Haematological and biochemical alterations in Korean catfish, *Silurus asotus*, experimentally infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research* **41**, 295-302.

35 CONCLUSÕES GERAIS

- a) Foi possível selecionar cepas bacterianas com potencial probiótico isoladas de peixes nativos do gênero *Pseudoplatystoma*.
- b) Das cepas bacterianas isoladas do trato digestivo, a cepa *Weissella cibaria* apresentou maior potencial para ser utilizada como probiótico, pois além apresentar ótimo crescimento *in vitro* colonizou o trato dos animais avaliados.
- c) Com utilização de prebióticos como a inulina foi possível alterar a concentração de probióticos nas dietas e aumentar a colonização do trato intestinal de híbridos resultantes do cruzamento entre “pintado” macho, *Pseudoplatystoma corruscans* e “cachara” fêmea, *Pseudoplatystoma fasciatum*.
- d) A utilização conjunta de probióticos e prebióticos, os chamados simbióticos, alterou os parâmetros imunológicos e hematológicos dos peixes híbridos.
- e) Após infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* subsp *hydrophila*, a suplementação dos animais pelos simbióticos alterou os índices hemato-imunológicos, microbiológicos e aumentou a sobrevivência.
- f) A utilização de probióticos com cepas isoladas do próprio *Pseudoplatystoma* frente a cepas isoladas de tilápias *Oreochromis niloticus* após infecção experimental com *Aeromonas hydrophila hydrophila*, propiciou aumento de 20% sobre os índices de sobrevivência.
- g) Este estudo comprovou a viabilidade e a eficácia da suplementação dietética com *W. cibaria* isolado do próprio surubim híbrido e sua utilização conjunta com prebióticos.

38. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cepa *Weissella cibaria*, isolada do próprio peixe híbrido de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara, (*P. fasciatum*), comprovou a viabilidade e a eficácia da suplementação conjunta com prebióticos, aumentando 20% os índices de sobrevivência após desafio via infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* subsp *hydrophila* quando comparada a cepas isoladas de outros animais como a cepa *Lactobacillus plantarum* isolada de tilápias *Oreochromis niloticus*.

No entanto ensaios à campo devem ser preconizados afim de testar a utilização desta cepa frente à realidade brasileira de cultivos comerciais de surubins híbridos.

Finalmente, deve-se também em próximos estudos idealizar juntamente com o auxílio das grandes áreas da microbiologia e imunologia ensaios que possibilitem a compreensão da atuação desta cepa no intestino desses animais relacionados à expressão gênica de fatores antimicrobianos expressos bem como viabilizar a produção desta em larga escala, com estudos de cinética de produção e seleção de meios de cultura propícios à produção massiva.

Este projeto tornou-se realidade devido à parceria entre instituições públicas e privadas, onde de um problema real (enfermidades bacterianas em organismos aquáticos) foi possível buscar em instituições públicas a solução alternativa ao uso de antimicrobianos à campo.

36 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, p.185-189, 2008.

ALAVANDI, S.V.; VIJAYAN, K.K.; SANTIAGO, T.C.; POORNIMA, M.; JITHENDRAN, K.P.; ALI, S.A.; RAJAN, J.J.S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, p.115-120, 2004.

ANTONY, S.P.; PHILIP, R. **Bioremediation in Shrimp Culture Systems**. NAGA, World Fish Center Quarterly, v. 29, n. 3, 2006.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish**. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2007. 552p.

AVENDÃÑO, H.R.E.; RIQUELME, C.E. Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. **Aquacultural Engineering**, v.36, p.97-104, 1999.

BALCÁZAR, J.L. et al. The role of probiotics in aquaculture, **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173–186, 2006.

BALCÁZAR, J.L. et al. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). **British Journal of Nutrition**, v.97, p.522–527, 2007a.

BALCÁZAR, J.L. et al. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.51, p.185–193, 2007b.

BENDER, J.; PHILLIPS, P. Review Paper: Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. **Bioresource Technology**, v.94, p.229–238, 2004.

BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture**, v.20, p.13-132. 1999.

BRUNO, D.W. The relationship between auto-agglutination, cell surface hydrophobicity and virulence of fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. **FEMS microbiology letters**, v.51, p.135-140, 1988.

BURR, G.; GATLIN, D.; RICKIE, S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and potencial application of prebiotics e probiotics in finfish aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, p.425-436, 2005.

CAMILLI A., BASSLER B.L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**, v.311, p.1113-1116, 2006.

CAMPOS, J.L. Pintado culture in Brazil. **Global Aquaculture Advocate**, v. 42, p.42-43, 2004.

CARNEVALI, O. et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v.258, p.430-438, 2006.

CEREZUELA, R. et al. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 5, p. 663-668, 2008.

CREPALDI, D.V. et al. O surubim na aquacultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, p. 150-158, 2006.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, p.130-135, 1960.

DECAMP, O., MORIARTY, D.J.W. Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. **World Aquaculture**, v.37, p.60-62, 2006.

DEFOIRDT, T. et al. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. **Aquaculture**, v.40, p.69-88, 2004.

DONG, Y.H. et al. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied Environmental and Microbiology**, v.68, p.1754-1759, 2002.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Roma:SOFIA, 2008, 21p.

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

FULLER, R. **History and development of probiotics**. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics: the Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, v.232, p.1-18, 1992.

FULLER, R.; GIBSON, G. R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 222, p. 28-31, 1997.

FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication. **Annual Reviews of Genetics**, v.35, p.439-468, 2001.

- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147–165, 1999.
- GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.14, n.1-3, p.107-114, 2008.
- GIBSON, G.R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.259–75, 2004.
- GIBSON, D. T. et al. Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2615-21, 1995.
- GIBSON, G.R.; MCCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.A. Probiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, v.93, p.S31-4, 2005.
- GISMONDO, M.R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p.287–292, 1999.
- GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; VELASCO-BLANCO, G. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. **Aquaculture**, v.211, p.43-48, 2002.
- GRIFFITH, D.R.W. **Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries**. In: Lavens, P.; Jaspers, E.; Roelands, I., LARVI '91-FISH AND CRUSTACEAN LARVICULTURE SYMPOSIUM, Editors, European Aquaculture Society, Gent, p. 478.Special publication n. 24, 1995.
- GRIMÓN, R.O.R.“**La tilapia y su efecto en La prevalência del vírus de La mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón**”, Tese de Graduação em Ciências, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil – Ecuador.2003.
- GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, pp.1-14, 2004.
- HIRATA, H. et al. Probiotic culture of the rotifer *Branchionus plicatilis*. **Hydrobiologia**, v.387/388, p.495–498. 1998.
- HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M.The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.813–835, 2005.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Review: Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**,v.25, p.633–642, 2002.

JATOBÁ, A. **Utilização de probiótico em sistema de policultivo de tilápias com cam arões m arinhos.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. **Pesquisa A gropecuária Brasileira**, v.43, p.1201-1207, 2008.

KARUNASAGAR, I. et al. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. **Aquaculture**, v.268, p.288–292, 2007.

KIM, D.H.; AUSTIN, B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. **Fish & Shellfish Immunology**, v.21, p.513–524, 2006a.

KIM, D.H.; AUSTIN, B. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.114, p.297–304, 2006b.

KLAENHAMMER, T.D.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **Internacional Journal Food Microbiology**, v.50, p.45–57, 1999.

LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, p.193–201, 2003.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v.164, p.201-230, 1998.

LIGHTNER, D.V., PANTOJA, C.R. **Infectious Myonecrosis (IMV): current status report on the biology of e tiological age nt an d de velopment of diagnostic methods.** FEIRA NACIONAL DO CAMARÃO (FENACAM), 3–7 Fevereiro, 2004. Anais, Rio Grande do Norte, Brasil, 2004, p. 22. .

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

LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESZIUS, P.H. Review: use of organic acids, salts in fish diets. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5 (9/10), p. 45 - 46, 2010.

LIN, H.Z. et al. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. **Aquaculture Research**, v.35, p.1441-1447, 2004.

LIU, C.H.; CHEN, J.C. Efect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, p.321-34, 2004.

MACMILLAN, J.R.; SCHNICK, R.; FORNSHELL, G. Volume of Antibiotics Sold (2001-2002) in US Domestic Aquaculture Industry. 2004.

- MAKRIDIS, P.; COSTA, R.A.; DINIS, M.T. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima* and effect on bacterial load of enriched *Artemia* metanauplii. **Aquaculture**, v.255,p.76–81, 2006.
- MARQUES, A. et al. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 5, p. 903-918, 2006.
- MELLO, G.L.; FARIAS, A.P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura**, v.102, p.42 – 47,2007.
- MERRIFIELD, D.L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v.302, n.1-2, p.1-18, 2010.
- MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review Microbiology**, v.55, p.165-199, 2001.
- MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* sp. in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164, p.351-358, 1998.
- MOURIÑO, J.L.P. et al. Characterization and experimental infection of *Flexibactermaritimus* in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p173-177. 2008.
- NIKOSKELAINEN, S. et al. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish Shellfish & Immunology**, v.15, p.443–452, 2003.
- ORTUÑO, J. et al. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.79, p.167-180, 2002.
- PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; KOBAYASHI, T. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.102, p.379–388, 2004.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKAMOTO, R.M. **Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá-PR. 1998, 264p.
- PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. **Aquaculture**, v.219, p.71-82, 2003.
- PIRARAT, N. et al. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.113, p.339–347, 2006.

PLANAS, M. et al. Robiotic effect in vivo of *Rosebacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus L.*) larvae. **Aquaculture**, v.255, p.323–333, 2006.

QUEIROZ, J.F.; BOYD, C.E. Effects of bacterial inoculums in channel catfish ponds. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.29, p.67–73,1998.

RAMIREZ, C. **Uso de bac térias l ácticas probióticas na al imentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como i nibidoras de micro-organismos patogênicos e estimulantes d o sistema imune.** 2005, Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RAMÍREZ, C. et al. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v.264, p.70-78, 2006.

RAO, S.P.S.; I. KARUNASAGAR. Incidence of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in tropical shrimp culture ponds. **Aquaculture International**, v.8, p.463-472, 2000.

RASCH, M. et al. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **System Applied Microbiology**. v.27, p.350-359,2004.

RENGPIPAT S. et al. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* Challenge in pond reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a bacillus probiotic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.55, p.169-173, 2003.

REYES-BERRECIL, M. et al. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p.731-739, 2008.

RINGO, E.; GATESOUBE, F. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v.160, p.177–203, 1998.

ROBERTSON, P.A.W. et al. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.32, p.151–155, 1998.

RONKART, S. N. et al. Impact of the Crystallinity on the Physical Properties of Inulin during Water Sorption. **Food Biophysics**, v. 4, n. 1, p. 49-58, Mar. 2009.

ROUBACH, R. et al. Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 34 (1), p. 28-34, 2003.

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

- SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v.34, n.8, p.1215-1226, 2008.
- SHARMA, R.; SCHEENO, T.P..Aquaculture wastes and its management. **Fisheries World**, p.22-24, 1999.
- VAZQUEZ, J.A.; GONZALEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v.245, p.149–161, 2005.
- VENKAT, H.K.; SAHU, N.P.; JAIN, K.K. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v.35, p.501-507, 2004.
- VERSCHUERE, L. et al. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000a.
- VERSCHUERE, L. et al. Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* cw8t2 by selected bacterial strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.1139–1146, 2000b.
- VIEIRA, F.N. et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.4, p.251-255, 2007.
- VIEIRA, F.N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.763-769, 2008.
- VIJAYAN, K.K. et al. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. **Aquaculture**, v.251, p.192-200, 2006.
- VILLAMIL, L. et al. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. **Aquaculture**, v.219, p.43–56, 2003.
- VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of fish candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.145-152, 2004.
- WACHE, Y. et al. Cross effects of the strain of dietary *Sacharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*, fry. **Aquaculture**, v.258, p.470-478, 2006.

WATZL, B.; GIRRBACH, S.; ROLLER, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. **British Journal of Nutrition**, v. 93, p. S49-S55, Apr. 2005.

WYBAN, J.A. et al. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. **Proceedings of expression session on shrimp farming**. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA. USA. pp.254-260. 1992.

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S.A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.25, p.7313-7318, 2009.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. **Aquicultura: Experiências Brasileiras** Florianópolis: Multitarefa Editora, p.337-368, 2004.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v.25, p.516– 524, 2006.