



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

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM BACTÉRIAS LÁCTEAS
SOBRE ALGUNS PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS DE
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) INFECTADO EXPERIMENTALMENTE
COM *Aeromonas hydrophila*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Aqüicultura da Universidade Federal de
Santa Catarina, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Aqüicultura.

Orientador: Maurício Laterça Martins
Co-orientador: Evoy Zaniboni Filho

GISELLE MARI SPECK

Florianópolis/SC
2010

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

S741s Speck, Giselle Mari

Suplementação alimentar com bactérias lácteas sobre alguns parâmetros hemato-imunológicos de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectado experimentalmente com *Aeromonas hydrophila* [dissertação] / Giselle Mari Speck ; orientador, Maurício Laterça Martins; - Florianópolis, SC, 2010.
95 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Aeromonas hydrophila*. 3. Jundiá.
4. Probióticos. I. Martins, Maurício Laterça
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

Suplementação alimentar com bactérias lácteas sobre alguns parâmetros hemato-imunológicos de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectado experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*.

Por

GISELLE MARI SPECK

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

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

Banca Examinadora:

Dr. Evoy Zaniboni Filho – *Coorientador*

Dra. Fabiana Garcia

Dra. Luciane Maria Perazzolo

*Aos meus pais Doris e Henderson
e ao meu irmão Matheus pelo amor e
apoio em todos os momentos da minha vida*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar realizando este trabalho.

A minha família, em especial aos meus pais, por tantos anos de dedicação e apoio. Vocês investiram e apostaram em mim e agora estamos colhendo os doces frutos. OBRIGADA por estarem ao meu lado em todos esses anos de batalha, pelo amor e apoio incondicionais!

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante os dois anos de realização do mestrado.

Ao professor Maurício Laterça Martins, pela competência, ensinamentos e oportunidade de trabalhar na área de Patologia durante quatro anos, compreensão frente às dificuldades enfrentadas e pela orientação durante a elaboração deste manuscrito.

Ao co-orientador Prof. Evoy Zaniboni Filho, que aceitou o desafio de me co-orientar na fase final do trabalho, pelas contribuições fornecendo mais subsídios na área de Piscicultura de Água Doce.

Aos membros da banca examinadora Fabiana Garcia, Luciane Maria Perazzolo e Alex Pires de Oliveira Nuñez, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

A Fundação Municipal do Desenvolvimento Rural 25 de Julho pela doação dos peixes e por proporcionar a realização de parte do experimento. Agradeço aos funcionários Marcão, Rafael, Marquinhos, Tiago, Marciano e Gibra pelo auxílio nas atividades de campo e ótima convivência, em especial ao responsável pela Estação de Piscicultura Roberto Hoppe, pela grande ajuda e por me proporcionar o aprendizado na prática sobre o cultivo de peixes.

A Dona Célia e Arthur pelo carinho, receptividade e pelas longas conversas durante a minha estadia no Hotel Angler Hof em Pirabeiraba- Joinville.

Ao Setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), em especial ao Adolfo Jatobá, Bruno Corrêa da Silva e José Luis Mourião pelo grande auxílio na realização das análises microbiológicas e estatísticas e pelos momentos de conversas informais por sanarem minhas dúvidas e pelas estimadas sugestões.

A Gabriela Tomas Jerônimo (Gabi), minha grande amiga de todas as horas, pelo incentivo, cumplicidade, paciência, e principalmente pela imensa ajuda nas amostras e pelo ombro amigo nas horas difíceis, pelas contribuições durante o trabalho.

Ao adorável amigo Keka, por tornar minhas tardes mais alegres e divertidas, pelo enorme carinho e amizade

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos – AQUOS, Daniela Bampi, Ágata Paseto, Ana Rosa Sá, Bia Lima, Eduardo Gonçalves, Natália Marchiori, Geovana Dotta pelos agradáveis momentos.

Ao Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce – LAPAD pela doação de peixes e colaboração.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e a turma de 2008, em especial à Ana Paula Oeda, Beatriz Nunes, Bruno M. Thormann, Cristhiane Guertler, Lin Hua Liu Iwersen, Paulo Bernardes da Costa, Fabíola Santiago Pedrotti, e Michele Cavalleiro Nunes, pelas palavras amigas nas horas difíceis, pelo auxílio nos trabalhos e dificuldades, mas principalmente por estarem comigo nesta caminhada tornando-a mais fácil e agradável.

As grandes amigas da graduação Manoela Costa Brandão (Manu), Cristhiane Guertler (Cris) e Bárbara Santos Menezes (Babi) que me incentivaram nos momentos mais difíceis e que perto ou longe, sempre me apoiaram e me ajudaram a seguir em frente.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação, pela paciência e doação durante o período das disciplinas fornecendo valiosos subsídios aos meus conhecimentos sobre pesquisa científica e aqüicultura.

Ao Carlito, secretário do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, pela imensa ajuda, paciência e dedicação.

Ao Jeff, grande amigo, sempre prestativo, pela prontidão em ajudar com os materiais, coletas e espaço físico para a realização do experimento.

Enfim, agradeço de coração, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste estudo, tornando este caminho mais suave de ser percorrido.

RESUMO

Respostas imunológicas inatas são úteis para determinar o estado de saúde de peixes e avaliar o efeito de substâncias imunomoduladoras no cultivo destes animais. A maioria dos estudos sobre a resposta imune inata de peixes baseia-se apenas nos efeitos de dietas suplementadas com imunoestimulantes. Em aquicultura, apenas alguns estudos correlacionam os efeitos da suplementação dos probióticos, especialmente envolvendo espécies nativas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos e a suscetibilidade do jundiá *Rhamdia quelen* a infecção da bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*, após a suplementação ou não com probiótico na dieta. Os probióticos testados foram *Leuconostoc lactis*, Q2 (não identificado) e *Lactobacillus plantarum* isolados e selecionados do trato intestinal de jundiás e tilápias, respectivamente, com a capacidade de colonizar e inibir possíveis patógenos *in vitro* e *in vivo*. A cepa que apresentou o melhor desempenho foi a *Leuconostoc lactis* foi utilizada no ensaio *in vivo*. O experimento consistiu de seis tratamentos com três repetições cada: Grupo A: Peixes alimentados com ração não suplementada com probiótico: T1 – Peixes não injetados (NiC); T2 – Peixes injetados com 1mL de solução salina estéril 0,65% (SalC) e T3 – Peixes injetados com 1×10^7 CFU/mL de *Aeromonas hydrophila* diluída em 1mL de solução salina esterilizada (AerC). Grupo B: Peixes alimentados com ração suplementada com probiótico: T4 – Peixes não injetados (NiP); T5 – Peixes injetados com 1mL de solução salina estéril 0,65% (SalP) e T6 – Peixes injetados com 1×10^7 CFU/mL de *Aeromonas hydrophila* diluída em 1mL de solução salina esterilizada (AerP). Vinte quatro horas após as injeções, os peixes foram anestesiados com benzocaína e o sangue coletado. Os parâmetros examinados incluíram as contagens totais de eritrócitos (RBC), de leucócitos (WBC) e de trombócitos, o percentual de hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, atividade aglutinante e antimicrobiana do soro dos peixes contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. A utilização de *Leuconostoc lactis* como probiótico na dieta promoveu a colonização do intestino de jundiás, mas não influenciou os parâmetros hemato-imunológicos quando comparado ao tratamento controle. Como perspectivas futuras, propõe-se a realização de ensaios *in vivo* e *in vitro* para verificar a possível atuação das bactérias probióticas isoladas como inibidoras de bactérias patogênicas ou na melhoria do sistema imunológico e desempenho zootécnico.

Palavras-chave: parâmetros hemato-imunológicos, *Aeromonas hydrophila*, *Rhamdia quelen*, probióticos.

ABSTRACT

Supplementary feeding with lactic acid bacteria on some haemato-immunological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*

The resistance of fish to microorganisms challenge depends mainly on the efficacy of the immune response. Most studies on the natural immune response of fish have focused on the effect of diets and immunostimulants. Few studies correlated the effects of probiotics supplementation in aquaculture, especially involving native fish species. Thus, this study aimed to investigate the modulation of some hemato-immunological parameters and susceptibility of silver catfish (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* infection, after fed or not probiotic supplemented diet. The experimental probiotics tested were *Leuconostoc lactis*, Q2 (non- identified) and *Lactobacillus plantarum*, isolated and select from the gastrointestinal tract of silver catfish and Nile tilapia, evaluating the capacity to colonize and inhibit possible pathogens *in vitro* and *in vivo*. The kind which that showed the best performance (*Leuconostoc lactis*) was utilized in the *in vivo* test. The experiment consisted of six treatments in triplicates: Group A: Fish fed unsupplement diet: T1 - non injected fish (NI), T2 - fish injected with 1 mL of sterile saline solution 0.65% (SAL); T3 - fish injected with 1×10^7 and 10^7 CFU/mL of *Aeromonas hydrophila* diluted in 1 mL sterile saline. Group B: Fish fed probiotic supplemented diet: T4 - non injected fish (NI), T5 - fish injected with 1 mL of sterile saline solution 0.65% (SAL) and T6 - fish injected with 1×10^7 and 10^7 CFU/mL of *Aeromonas hydrophila* diluted in 1 mL sterile saline. Twenty-four hours after injection, the fish were anesthetized and the blood collected. The examined parameters were: red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts, hematocrit, number of total thrombocytes, differential counting of WBC, agglutinating titer and antimicrobial activity of the serum against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Supplementation with probiotic did not influence the survival, red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts, hematocrit, number of total thrombocytes, differential counting of WBC, agglutinating titer and antimicrobial activity. However, the results not demonstrate the effectiveness of probiotics supplementation for silver catfish, it provided for the settling of the intestine of this, as well as the modification of its microbiota. These results suggested that the search for alternatives as probiotic bacteria may be performed.

Keywords: hemato-immunological parameters, *Aeromonas hydrophila*, *Rhamdia quelen*, probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Contagem de bactérias do trato intestinal de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>).....	52
---	----

ANEXO

Figura 2 – Atividades realizadas na Fundação Municipal para o Desenvolvimento Rural 25 de Julho: A: Captura dos peixes; B: Colocação dos tanques-rede; C- Unidades experimentais; D: Arraçoamento dos peixes.....	96
Figura 3 – Atividades realizadas no Laboratório AQUOS: A: Unidades experimentais; B: Coleta de sangue; C: Contagem de células sanguíneas; D: Biometria dos peixes.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios dos halos de inibição (mm) de bactérias ácido láticas contra cepas de bactérias patogênicas 51

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*) após a infecção com *Aeromonas hydrophila* e salina alimentados com ração comercial (controle) e ração suplementada com probiótico. Os tratamentos consistiram em **NiC**: animais não injetados alimentados com ração comercial. **NiP**: animais não injetados alimentados com ração suplementada com probiótico. **SalC**: animais injetados com 1,0 mL de solução salina estéril a 0,65 % por via intraperitoneal e alimentados com ração comercial. **SalP**: animais injetados com 1,0 mL de salina e alimentados com ração suplementada com probiótico. **AerC**: animais injetados com 1,0 mL de salina contendo 10^7 UFC de *Aeromonas*/mL alimentados com ração comercial. **AerP**: animais injetados com 1,0 mL de salina contendo 10^7 UFC de *Aeromonas*/mL alimentados com probiótico. .. 54

Tabela 3 – Parâmetros de qualidade de água nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Valores apresentados em me dias \pm desvio padrão. As letras representam as diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey. 55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
<i>Aspectos relacionados ao cultivo de peixes nativos</i>	15
<i>Enfermidades bacterianas nas pisciculturas</i>	18
<i>Algumas considerações sobre o sistema imune dos peixes</i>	18
<i>Parâmetros hemato-imunológicos como indicadores de infecção microbiana em peixes</i>	27
<i>Probióticos e o sistema imune</i>	30
1.1 OBJETIVOS	37
Objetivo Geral	37
Objetivo Específico	37
Suplementação alimentar com bactérias lácteas sobre alguns parâmetros hemato-imunológicos de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) infectado experimentalmente com <i>Aeromonas hydrophila</i>	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 Animais	43
2.2 Ensaio <i>in vitro</i>	43
2.2.1 Isolamento de bactérias ácido lácticas	43
2.2.2 Seleção <i>in vitro</i> de bactérias isoladas do intestino de jundiás	44
2.2.3 Antagonismo frente a patógenos	44
2.3 Ensaio <i>in vivo</i>	45
2.3.1 Avaliação das cepas selecionadas como probióticos através da sua colonização do trato intestinal de jundiás	45
2.3.2 Preparo da dieta suplementada com bactérias isoladas de jundiá	45
2.3.3 Avaliação da microbiota do trato intestinal dos jundiás	46
2.3.4 Preparo do inóculo	46
2.3.5 Infecção experimental	47
2.3.6 Observação de sinais clínicos	47
2.3.7 Análise hematológica	48
2.3.8 Capacidade aglutinante do soro	48
2.3.9 Determinação da atividade antimicrobiana	49
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Isolamento e seleção <i>in vitro</i>	50

4.2	Colonização do trato intestinal de jundiás	52
4.3	Indicadores hematológicos.....	53
4.4	Título aglutinante do soro	55
4.5	Atividade antimicrobiana do soro	55
4.6	Monitoramento dos parâmetros de qualidade de água e biometria .	55
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÃO.....	62
7	AGRADECIMENTOS.....	62
8	REFERÊNCIAS.....	63
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	76

1 INTRODUÇÃO

Aspectos relacionados ao cultivo de peixes nativos

A produção de pescados no Brasil em 2007 foi de 1.090.000 toneladas (IBAMA, 2009). De acordo com estas estatísticas, foram cultivadas aproximadamente 114 mil toneladas de peixes exóticos e 58 mil toneladas de peixes nativos, respectivamente, 67% e 33% da produção total de peixes no país. O Brasil apresenta condições favoráveis para a expansão de sua produção pela abundância de recursos hídricos, clima predominantemente tropical, e tecnologia pesqueira em desenvolvimento (PEREIRA, 2007) Além disso, uma característica importante do potencial da piscicultura brasileira é o grande número de espécies cultivadas, cada uma com suas peculiaridades e diferentes formas de cultivo (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005). No entanto, diante do grande número de espécies e híbridos de peixes que estão sendo cultivados, a participação das espécies nativas na piscicultura nacional ainda é modesta (KUBITZA et al., 2007).

As espécies nativas de grande difusão no Brasil são amazônicas, não só devido ao porte, crescimento ou sabor da carne, mas principalmente porque estas espécies evoluíram em ambiente hipóxico, ou anóxico em determinado período. Com o passar das gerações, essas espécies desenvolveram adaptações para conviver com pouco oxigênio dissolvido na água, principal dificuldade encontrada em tanques de criação (CRESCÊNCIO, 2005). Nos últimos anos as pesquisas sobre as espécies nativas de diferentes bacias hidrográficas têm aumentado consideravelmente no país, devido à grande diversidade de espécies e capacidade de crescimento, entre elas destacam-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), pirarucu (*Arapaimas gigas*), dourado (*Salminus brasiliensis*), trairão (*Hoplias lacerdae*), jundiá (*Rhamdia quelen*), entre outras espécies que compõem nossa fauna (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005).

Neste contexto, o cultivo de espécies nativas é uma alternativa racional, de grande valor econômico e ecológico, visto que as criações de espécies alóctones em ambientes tropicais podem causar alterações no habitat e na estrutura da comunidade, hibridização, perda do patrimônio genético original, alterações tróficas, introdução de enfermidades e parasitos. Tais modificações podem acarretar redução da biodiversidade em ambientes naturais, ou ainda, homogeneização da biota (VITULE et al., 2009).

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard 1824, Siluriforme: Heptapteridae) é um bagre nativo da América Latina, presente em bacias hidrográficas desde o sudeste do México até o centro da Argentina (ZANIBONI- FILHO, 2004). A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde que foi descrita e a revisão de SILFVERGRIP (1996) já apresenta algumas contestações (BALDISSEROTTO, 2004). A coloração do jundiá varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. *R. quelen* vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (BALDISSEROTTO, 2004).

Esta espécie vem despertando interesse na aquíicultura, devido a características zootécnicas favoráveis, hábito onívoro, adaptado a diferentes ambientes (BALDISSEROTTO, 2004) e sua carne é apreciada devido à qualidade e ausência de espinhos intramusculares, além de apresentar boa aceitação no mercado consumidor (GOMES et al., 2000; TOWNSEND e BALDISSEROTTO, 2001; FRACALOSSO et al., 2007; SILVA et al., 2008). O cultivo deste peixe é marcado pelo rápido crescimento, boas taxas de conversão alimentar e, sobretudo pela tolerância a baixas temperaturas, garantindo crescimento contínuo inclusive no inverno (FRACALOSSO et al., 2004). Em função destas características, o jundiá é considerado uma das espécies de peixes nativos com grande potencial para o cultivo intensivo.

O Brasil é o principal produtor mundial de jundiá, representando cerca de 1,4% do total de pescado produzido pelo setor aquícola brasileiro no ano de 2000 (BOMBARDELLI et al. 2006). O cultivo de jundiá está mais concentrado na região sul, principalmente no Rio Grande do Sul (LAZZARI et al., 2006). Em Santa Catarina, das 22.917,5 toneladas produzidas de peixes de água doce no estado, 7% representam o cultivo de bagres, incluindo bagre americano “catfish” (*Ictalurus punctatus*), jundiá e bagre africano (*Clarias gariepinus*), atrás apenas da criação de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e carpas (comum - *Cyprinus carpio*; capim - *Ctenopharingodon idella*; prateada - *Hypophthalmichthys molitrix*; cabeça grande - *Aristichthys nobilis*) (EPAGRI/CEPA, 2009). Na região Sul do Brasil frequentemente é realizado sua criação em policultivo (jundiá, carpa ou tilápia) (BALDISSEROTTO, 2009). Segundo estatísticas do IBAMA (2009), a produção de jundiás em Santa Catarina foi de 303 toneladas no ano de 2007. Entretanto, em cultivo comercial, o jundiá está submetido a situações de estresse como variações bruscas de temperatura e baixas

concentrações de oxigênio na água, que afetam seu metabolismo e, conseqüentemente, comprometem sua imunidade (BRANDÃO, 2004).

Enfermidades bacterianas nas pisciculturas

Com a intensificação do cultivo na piscicultura, há aumento da incidência e severidade de doenças bacterianas, assim como a introdução e disseminação de novas enfermidades (VANDENBERG, 2004). Durante o processo de cultivo, os peixes são constantemente submetidos a diferentes procedimentos de manejo e variações ambientais, que alteram o equilíbrio orgânico e podem levar a inibição do crescimento, podem determinar mudanças na composição da microbiota intestinal, falhas na reprodução e resistência que induzem a proliferação de patógenos, tornando os peixes mais suscetíveis às enfermidades, com conseqüente prejuízo para o produtor (FAGUNDES, 2009). Com isso, existe um crescente interesse na busca de soluções que permitam minimizar os danos causados pelo manejo e pelo ambiente.

Dentre as enfermidades diagnosticadas em peixes, as de etiologia bacteriana estão entre as mais impactantes, devido às altas taxas mortalidade e ao custo elevado para sua prevenção e controle. Destacam-se, neste sentido, os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (PAVANELLI et al., 2002; MARTINS et al., 2008). Estas bactérias podem ser encontradas nos órgãos internos como rim, fígado, intestino, coração, cérebro e baço (PLUMB, 1997; SHOEMAKER e KLESIUS, 1997; CAI et al., 2004; LIM e WEBSTER, 2006) e estão presentes na superfície corporal e brânquias dos peixes (KOZINSKA, 2007).

A *Aeromonas hydrophila* é um dos mais importantes patógenos descritos na aquicultura brasileira (GODOY et al., 2008). A enfermidade causada por esta bactéria pode comprometer as brânquias, tegumento e intestino de exemplares perfeitamente saudáveis, sendo especialmente abundantes em águas com qualidade alterada, especialmente com baixos níveis de oxigênio e altos níveis de matéria orgânica e poluentes (MERINO et al., 1995; KIROV et al., 2002; WHO, 2004; FIGUEIREDO et al., 2008). Estas bactérias são Gram negativas e tipicamente oportunistas, organismos patogênicos facultativos, e manifestam-se em hospedeiros enfraquecidos e atacados por outros agentes etiológicos. São, portanto considerados invasores secundários que se estabelecem em condições particulares, se instalam rapidamente e se desenvolvem ao mesmo tempo em que outras infecções, sendo estas exacerbadas pelo desenvolvimento de *Aeromonas*, que são geralmente a

causa última da morte do hospedeiro (PAVANELLI et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2008). Os sinais clínicos de infecção podem variar de lesões de pele, superficiais ou profundas, a quadros típicos de septicemia. As lesões de pele podem se apresentar como áreas de hemorragia e necrose de extensão variada, que podem progredir para úlceras que acometem geralmente o tecido muscular. Nos quadros de infecção sistêmica são observados a exoftalmia, abdômen distendido contendo líquido serosanguinolento e presença de petéquias hemorrágicas nas vísceras (PAVANELLI et al., 2002).

Os fatores de virulência desta bactéria estão relacionados com a invasão, replicação e evasão do sistema imune hospedeiros, além de provocarem as lesões durante a patogênese da doença (VILCHES et al., 2004). Vários fatores de virulência têm sido descritos em *Aeromonas hydrophila* (ANGKA et al., 1995; VILCHES et al., 2004).

No Brasil, as bactérias do gênero *Aeromonas* são um dos principais causadores de consideráveis perdas na piscicultura (BELÉM-COSTA e CYRINO, 2006). Em São Paulo, foi relatado que 48% das amostras de carne de "pintado" (*Pseudoplatystoma* sp.), coletadas em supermercados, foram positivas para *Aeromonas* (RALL et al., 1998). SHAMA et al. (2000), isolando e identificando bactérias patogênicas em jundiás criados em tanque em Santa Maria (RS), observaram que *A. hydrophila* apareceu em 6% dos animais examinados presentes nos rins e superfície corporal. BOIJINK e BRANDÃO (2001) em experimento com jundiás inoculados por injeção intramuscular com bactéria *Aeromonas hydrophila*, observaram comportamento alterado, com perda de equilíbrio e movimentos respiratórios lentos nas horas que antecederam a morte. Os peixes mortos apresentaram ascite contendo fluido mucoso amarelado, exoftalmia, coloração anormal e erosão nas nadadeiras, além de apresentarem úlceras com bordas avermelhadas no local da inoculação e brânquias e demais órgãos internos pálidos e flácidos.

HIRSCH et al. (2006), estudando a distribuição das espécies de *Aeromonas* em tilapiculturas localizadas na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais, verificaram a ampla distribuição de diferentes espécies entre as propriedades estudadas, foram encontradas espécies potencialmente patogênicas aos peixes (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. schubertii*), foram isoladas também espécies potencialmente patogênicas a seres humanos (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii bt veronii*, *A. schubertii*, e *A. jandaei*), implicando em risco ao consumidor.

Algumas considerações sobre o sistema imune dos peixes

A imunidade dos organismos aquáticos é ainda pouco entendida, envolvendo um conjunto de barreiras e mecanismos físicos, químicos ou celulares de um ser vivo capaz que prevenir ou combater agressões de origem física, química ou biológica provenientes do ambiente que os cercam (FIGUEIREDO et al., 2008). Em contribuição, diversos compostos imunestimulantes derivados de plantas, algas marinhas etc, (DÚGENCI et al., 2003; FARIAS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009), as vacinas (FIGUEIREDO et al., 2009) e probióticos (ALY et al., 2008; JATOBÁ et al., 2008), têm sido empregados na prevenção do estresse e enfermidades em peixes, de maneira a manter o estado de equilíbrio homeostático (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

O sistema imunológico dos peixes está intimamente relacionado ao sangue. O sangue é um tecido fluido composto de um plasma líquido e componentes celulares (RANZANI-PAIVA, 2007), responsável pela distribuição de calor, transporte de gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção. A presença, quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico (vascular) refletem o estado fisiológico do organismo, apresentando ampla variação em função de fatores externos e internos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Os peixes possuem um sistema imunológico composto por sistema imune inato (do próprio animal ou espécie) e adaptativo ou adquirido (ligados à imunidade dos peixes e adquiridas ao longo de sua vida e exposições a patógenos e parasitos) que podem ser de dois tipos: a imunidade mediada por células e a imunidade humoral. Segundo IWANA e NAKANISHI (1996), fatores celulares e humorais de ambos os sistemas, inato e adquirido, promovem nos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Apesar da distinção na classificação desses dois sistemas de defesa, deve-se entender que quando um agente patogênico entra em contato com o hospedeiro, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imune, sendo que os fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (FERNANDEZ et al., 2002).

O mecanismo de defesa inato ou natural pode ser ativado por diversos estímulos como patógenos (bactérias, vírus, fungos, ou parasitos) ou uma substância estranha ao organismo. O sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa, que consiste de barreiras físicas que incluem escamas, muco, brânquias e epiderme, imunócitos incluindo as células fagocíticas, células citotóxicas não-

específicas, células endoteliais e uma ampla variedade de componentes humorais tais como transferrina, lisozima, sistema complemento, inibidores de protease, anticorpos naturais, lecitinas, pentraxinas, citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos de secreção interna de vários tecidos e tipos de células (MAGNADÓTTIR, 2006; AOKI et al., 2008).

Considerado uma das principais barreiras de defesa contra organismos patogênicos, o muco também possui a propriedade de reduzir o atrito do corpo do peixe com a água, facilitando, não apenas sua natação, mas também contribuindo na função osmorregulatória do animal (KUBITZA e KUBITZA, 1999). O muco de superfície contém diversos compostos como lectinas, lactoferrinas, lisozimas, enzimas proteolíticas, fosfatase alcalina e esterase, componentes do sistema complemento, peptídeos antibacterianos, hemolisina, imunoglobulina M e pentraxinas que inibem ou dificultam a infecção e disseminação de patógenos (FIGUEIREDO et al., 2008) e são substâncias com atividades biostáticas ou biocidas (PALAKSHA et al., 2008), enquanto aquele conhecido como mucopolissacarídeo se faz presente na pele, o qual encontra-se, na sua grande maioria, na forma de agregados complexos denominados de proteoglicanos (RODRIGUES e BENEVIDES, 2010).

Os receptores envolvidos na resposta da mucosa epitelial são receptores tipo “Toll” e “NODs” (domínio de oligomerização de nucleotídeo) (MEDZHITOV, 2007). O reconhecimento do patógeno ocorre por meio de “células apresentadoras de antígenos” e das células epiteliais que constituem a barreira celular primária (FRITZ et al., 2007).

Outra barreira física importante são as brânquias possuem como propriedade a regulação do equilíbrio osmótico, a excreção de parte do nitrogênio dos resíduos compostos e gás, água e troca de íons (TORT et al., 2003).

Quando um patógeno entra em contato com o hospedeiro pela primeira vez, os mecanismos inatos são usualmente suficientes para prevenir a infecção, através das atividades dos leucócitos, os quais possuem uma elevada atividade fagocítica, destruindo os organismos patogênicos e que podem ser auxiliados pelo sistema complemento. Durante este ato, acionam os mecanismos adaptativos de defesa que produzirão a memória imunológica, bloqueando o desenvolvimento de uma nova infecção causada pelo mesmo patógeno SHOEMAKER et al., 2001; MAGNADOTTIR, 2006).

As respostas imune adaptativas são dependentes das atividades dos linfócitos T e B, que atuam na produção de imunoglobina

específica, atividade citotóxica e imunomodulação via citocinas (SHOEMAKER et al., 2001), que contribuem para a resposta mais eficiente contra a infecção (MCGUINNESS et al., 2003; MEDZHITOV, 2007) leva a formação de anticorpos e memória imunológica após o reconhecimento do agente invasor pelas células do sistema imune e também se apresenta dividida em resposta imune humoral e celular (SECOMBES, 1996; IWAMA E NAKANISHI, 1996; BERNSTEIN et al., 1998).

No sistema imune adaptativo, macrófagos e, especialmente, as células dendríticas agem como “células apresentadoras de antígenos”, apresentando antígenos aos linfócitos T. Estes agem liberando fatores solúveis (citocinas) que ativam os fagócitos, os quais, por fagocitose, destroem os patógenos. Em outro tipo de interação, fagócitos utilizam anticorpos liberados pelos plasmócitos derivados de linfócitos B a fim de permitir o reconhecimento mais eficiente dos elementos agressores pelas células de defesa (WEDEMEYER, 1996). Uma consequência destas interações é que a maioria das respostas imunes a agentes infecciosos é realizada por uma variedade de mecanismos inatos e adquiridos, ou seja, nas fases iniciais da infecção, há predomínio das respostas inatas, e nas fases mais tardias, os linfócitos passam a gerar respostas imunes adquiridas (NAYAK, 2010).

A resposta imunológica adaptativa desenvolve-se após o contato entre as células do sistema e um patógeno como, por exemplo, vírus, bactérias ou protozoários, o que lhe confere caráter de especificidade (ROITT et al., 2003). Estas células são capazes de identificar e reagir somente com as moléculas que são estranhas ao organismo. Outro fator que colabora para a ativação do sistema imunitário adaptativo é o fato da agressão pelo agente ser reincidente, pois uma característica específica deste sistema é a produção de uma memória imunológica a partir da primeira infecção (PARHAM, 2001).

Já quando há a ativação do sistema humoral, pela entrada de um antígeno no organismo chegando a um órgão linfóide, os linfócitos B dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando os plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória, que produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Estas células de memória estão aptas a responder prontamente a um próximo contato com o antígeno (SECOMBES, 1996; KAATTARI e PIGANELLI, 1996).

A via celular é representada pelos linfócitos T (linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T supressores e linfócitos T memória) que possuem a capacidade de reconhecer antígenos que se ligam aos marcadores de superfície de macrófago e assim promover a

sua proliferação (SECOMBES, 1996).

Os principais componentes do sistema imune dos peixes são as células brancas do sangue, os leucócitos, produzidos, principalmente, no rim cefálico, timo e baço (HRUBEC e SMITH, 2000; TORT et al., 2003). Os leucócitos descritos em peixes teleósteos são os neutrófilos, monócitos/macrófagos, células B, plasmócitos, células T, células “natural killer”, eosinófilos e basófilos (SECOMBES, 1996; WHYTE, 2007; ALVAREZ-PELLITERO, 2008). Alguns estudos recentes confirmam a função de determinados leucócitos como “células apresentadoras de antígenos” ou células dentríticas (ARAKI et al., 2008; ALVAREZ-PELLITERO, 2008).

Como os peixes são desprovidos de medula óssea e linfonodos, os tecidos mielóides e linfóides estão, geralmente, associados ao mesmo órgão e podem apresentar função imuno-endócrina, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (TORT et al., 2003). A mielopoiese geralmente ocorre no rim anterior e/ou baço, considerando que o timo, rim e baço são os principais órgãos linfóides (ZAPATA et al., 2006).

O rim anterior é considerado o órgão primário de células B, servindo também como órgão linfóide secundário (análogo ao linfonodo) e no “clearance” de antígenos solúveis e particulados da circulação, sendo este o principal local de produção de anticorpos (WHYTE, 2007).

O baço dos teleósteos também está incluído na eliminação de antígenos transportados pelo sangue e complexos imunes em elipsóides vasos sanguíneos, além de apresentar os antígenos e na iniciação da resposta imune adaptativa (WHYTE, 2007). O baço e o rim anterior apresentam agregados de macrófagos, os quais também se desenvolvem em associação com lesões inflamatórias crônicas em outros órgãos (AGIUS e ROBERTS, 2003).

O timo, órgão linfóide pouco conhecido nos teleósteos, constitui o local de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T. O timo pode ser considerado como agregação de encapsulados de macrófagos que processa a proliferação de células T (ALVAREZ-PELLITERO, 2008).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) de teleósteos é constituído principalmente por diferentes tamanhos de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, além de diversos tipos de granulócitos, células PAS positivas e eosinófilos granulares (ZAPATA e AMEMIYA, 2000). Os eosinófilos são células frequentemente envolvidas na resposta a doenças parasitárias (ALVAREZ-PELLITERO, 2008).

Embora praticamente todos os tipos de leucócitos contribuam

para a defesa do hospedeiro, há três tipos que desempenham funções especialmente importantes. Os neutrófilos e a série de monócitos-macrófagos são células fagocíticas, que atuam primariamente ingerindo e digerindo bactérias, restos celulares e outros materiais particulados (VALE et al., 2002).

Os monócitos são provavelmente as células sanguíneas mais importantes da resposta imune devido à capacidade de fagocitar material estranho ao hospedeiro, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (FALCON, 2007). Os monócitos possuem ainda atividade citotóxica não-específica e são consideradas células em trânsito no sangue e, durante o processo inflamatório, migram para tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos (WHYTE, 2007). A quantidade de monócitos no sangue pode variar conforme o sexo e/ou o estágio de maturação gonadal. O aumento do número dessas células pode ser interpretado como uma reação do peixe frente à suscetibilidade de adquirir alguma enfermidade, devido ao desgaste provocado pela reprodução e todas as suas implicações (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Os macrófagos são células multifuncionais, pois além de participarem da fase crônica da reação inflamatória desencadeiam e modulam vários eventos da fase aguda. Quando ativados por endotoxinas ou linfócitos T convertem a arginina em óxido nítrico que exerce ações bactericidas, tumoricidas e fungicidas e secretam mais de cem substâncias biologicamente ativas (SECOMBES et al., 2001).

A reação inflamatória inespecífica e a resposta imunológica nas quais ocorre à fagocitose são de extrema importância nos mecanismos de defesa do hospedeiro, pois os monócitos do sangue periférico transformam-se em macrófagos e migram para o foco inflamatório. Na aquíicultura há interesse especial em aumentar a resistência à doenças e o incremento da atividade fagocitária de células de defesa é um aspecto importante. Aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos induzida pela liberação de fatores ativadores de macrófagos resulta da inoculação de patógenos mortos ou de seus produtos assim como da aplicação de imunostimuladores e adjuvantes (TAVARES DIAS e MORAES, 2004).

O terceiro grupo, constituído pelos linfócitos e células relacionadas, são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovem a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuam no processo de memória imunológica e promovem a

liberação de fatores reguladores da função imune (YOSHINAGA et al., 1996). Ainda são muito variados os dados sobre a porcentagem de linfócitos sanguíneos encontrados nos experimentos realizados com peixes, podendo receber influência de muitos fatores, tais como espécie, condições de coleta e armazenamento do sangue e variações ambientais (FERNANDEZ et al., 2002). Os linfócitos se caracterizam em dois grupos distintos de populações chamados linfócitos B e T. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória e participam da resposta imune humoral, enquanto os linfócitos T possuem diferentes tipos e desempenham funções específicas:

- Linfócitos T auxiliares: reconhecem antígenos (qualquer substância estranha que possa induzir a resposta imune) específicos ligados à marcadores e liberam mensageiros químicos que estimulam a atividade de células como os fagócitos, os linfócitos B e outros linfócitos T;
- Linfócitos T citotóxicos: reconhecem e destroem células infectadas, quando ativos, migram para o local de infecção ou para o timo e segregam substâncias tóxicas que matam as células anormais;
- Linfócitos T supressores: por meio de mensageiros químicos, ajudam a moderar ou a suprimir a resposta imune quando a infecção já está controlada;
- Linfócitos T memória: vivem em estado inativo, mas respondem de imediato quando em contato posterior com o mesmo antígeno (TIZARD, 2002).

Os fagócitos são as células mais importantes do mecanismo celular não-específico e são auxiliadas por vários fatores solúveis tais como complemento e lisozima. As células fagocíticas ou fagócitos (granulócitos (neutrófilos), monócitos e macrófagos) desempenham um papel importante na regulação do sistema imune pelo mecanismo de fagocitose, que constitui como a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos. Estas células são capazes de englobar a bactéria e matá-la pela geração de ânion superóxido (O_2^-) e seus derivados, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres (OH^\cdot) em um processo conhecido como “burst” respiratório, que culmina com a inibição do crescimento ou a completa destruição dos microrganismos invasores. Os intermediários reativos ao oxigênio possuem potente atividade bactericida (SAKAI et al., 2001; HERNANDEZ e TORT, 2003; SELVARAJ et al., 2006; AI et al., 2007; MAITA, 2007; LIN et al., 2009; SIWICKI et al., 2009).

Nos peixes, os trombócitos também são referidos como células de defesa, pois contém arsenal próprio para fagocitose, como glicogênio

associado ao fornecimento de energia devido ao aumento do metabolismo dos carboidratos pela glicólise (PASSANTINO et al., 2005; TAVARES-DIAS, 2006), fosfatase ácida (SCHÜTT et al., 1997) e alcalina (PASSANTINO et al., 2005) e fagocitam bactérias e outros antígenos (KOLMAN et al., 2003).

A lisozima é uma enzima lítica de origem leucocitária de grande importância na defesa do organismo contra patógenos. Em peixes, encontra-se amplamente distribuída em locais onde há maior probabilidade de ocorrer uma invasão bacteriana e em tecidos com grande quantidade de leucócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) como pele, muco, baço, fígado, músculo, brânquias, trato intestinal, soro, tecidos linfóides e outros fluidos corporais (SAURABH e SAHOO, 2008). A lisozima divide os peptidoglicanos que compõem a parede celular das bactérias gram-positivas e destrói algumas bactérias Gram-negativas em conjunto com o sistema complemento (TIZARD, 2002). Os níveis de lisozima podem apresentar variações devido à sazonalidade, sexo, maturação sexual, alimentação, temperatura da água, estresse, poluição e infecções (HERNÁNDEZ e TORT, 2003). A mensuração da lisozima pode ter valor diagnóstico na determinação da condição imunológica e resistência à doenças (SAURABH e SAHOO, 2008).

Em alguns estudos, temperaturas fora da zona de valores a que o peixe está aclimatado, em geral inibem as funções dos fagócitos. Situações de estresse, carência alimentar e algumas doenças podem diminuir a atividade do sistema imunológico dos peixes, como também, a presença de certos poluentes na água tem efeitos supressores sobre a atividade dos fagócitos dos peixes (HERNÁNDEZ e TORT, 2003).

A ativação do sistema complemento é um caminho alternativo em situações de emergência, sendo uma potente defesa inata contra organismos invasores como bactérias, fungos, vírus e parasitos (LIN e SHIAU, 2005). O sistema complemento é um conjunto de proteínas solúveis e outros componentes no plasma que estão envolvidos nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (SECOMBES, 1996; CLAIRE et al., 2002; BOSHRÁ e SUNYER, 2006), além de ser considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório e na resposta imune. Estas proteínas normalmente se encontram na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea, e sua ativação ocorre de maneira sequencial, em efeito cascata, graças a um estímulo inicial em que cada componente contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado (RUS et al., 2005).

O sistema complemento pode ser ativado por três vias distintas denominadas vias clássica, alternativa e da lectina (HOLLAND e LAMBRIS, 2002). A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e agregados de imunoglobulinas, enquanto que a via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada, mas da presença de fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos são suficientes para a produção das proteínas solúveis no plasma. Em peixes, a atividade bactericida é decorrente principalmente de ativação da via alternativa (BOSHRA e SUNYER, 2006).

Dentre as ações das proteínas do sistema complemento, a mais conhecida é a capacidade de destruir patógenos criando perfurações em suas membranas, ação que caracteriza a via alternativa do sistema. As proteínas do sistema complemento também estão envolvidas nos mecanismos de recrutamento de células fagocíticas em reações inflamatórias e na exposição de antígenos aos linfócitos, atividades relacionadas com a via clássica do sistema (CLAIRE et al., 2002; BOSHRA e SUNYER, 2006).

As lectinas e/ou aglutininas são proteínas ou glicoproteínas com capacidade de se ligar especificamente a açúcares da superfície de diferentes células, causando sua aglutinação. Esta propriedade deriva do fato de estas moléculas, assim como os anticorpos dos vertebrados, possuírem pelo menos dois sítios de ligação (moléculas bivalentes), sendo assim capazes de aglutinar células que expressem determinados açúcares na sua superfície. Estudos com estas proteínas têm sido realizados, entretanto sua relação com a imunidade dos peixes ainda não está bem esclarecida. As pentraxinas são lectinas presentes nos fluidos corporais dos vertebrados e estão associadas com a resposta aguda e podem ocasionar um aumento nos níveis do soro após uma lesão tecidual ou infecção através da ativação do sistema complemento e desempenham um papel no reconhecimento e eliminação de células apoptóticas (MAGNADOTTIR, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são amplamente distribuídos na natureza como mecanismos de defesa em peixes e podem ser ativados contra bactérias (CUESTA et al., 2008; MAIER et al., 2008).

Os anticorpos (imunoglobulinas) são parâmetros imunes adquiridos que também podem ser classificados como componentes do sistema inato. A importância dos anticorpos naturais nos peixes tem sido demonstrada em vários estudos através da manutenção da homeostase e na remoção de células apoptóticas (MAGNADÓTTIR, 2006).

Segundo SHOEMAKER et al. (2007) e SAURABH e SAHOO (2008) a resposta imune dos peixes pode ser influenciada por vários fatores dentre os quais se destacam:

- a) Genética: variação individual da resposta imune inata e adquirida;
- b) Ambiente: fotoperíodo, temperatura da água e estação do ano;
- c) Estresse: qualidade da água, poluição, densidade de estocagem e manejo de modo geral;
- d) Nutrição: qualidade e quantidade da dieta fornecida, fatores antinutricionais, concentração dos microingredientes e uso de imunostimulantes, vacinas e probióticos;
- e) Patógeno: nível de exposição, tipo (parasito, bactéria, vírus) e a virulência.

O entendimento e compreensão da biologia dos peixes, em particular da resposta imune é importante para um manejo sanitário apropriado. O sistema inato dos peixes tem gerado interesse crescente nos últimos anos e considerado um fator chave na defesa primária e na organização da imunidade adquirida (WHYTE, 2007). Entretanto, ainda existem importantes lacunas no conhecimento de numerosos mecanismos imunes, além da disponibilidade e variação de informações de acordo com a espécie de peixe (ALVAREZ-PELLITERO, 2008). Recentemente, iniciaram-se os estudos sobre imunologia de peixes nativos como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon amazonicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (ABREU, 2007; BILLER, 2008; OLIVEIRA, 2008; CHAGAS et al., 2009; CHAGAS, 2010). Contudo, a maioria dos estudos sobre imunologia de peixes, incluindo espécies nativas, tem sido relacionada somente a imunidade inata (SECOMBES, 1996; MAGNADOTTIR, 2006; ZAPATA et al., 2006; WHYTE, 2007; ALVAREZ-PELLITERO, 2008).

Parâmetros hemato-imunológicos como indicadores de infecção microbiana em peixes

As variáveis hematológicas representam uma importante ferramenta na identificação do estresse ocasionado pelo ambiente de cultivo e pelos parasitos, utilizados como indicadores biológicos no monitoramento da sanidade dos peixes e das boas condições ambientais. (DE PEDRO et al., 2005; ISHIKAWA et al., 2008; MARTINS et al., 2008; TAVARES-DIAS et al., 2009). Essas informações podem ser utilizadas para avaliar o estado fisiológico de peixes, padronizando as

condições ideais para o seu cultivo. Estudos sobre os parâmetros hematológicos de peixes brasileiros em condições de cultivo, têm aumentado nas últimas décadas (ARAÚJO et al., 2009), pois as variáveis relativas ao eritrograma auxiliam na identificação de processos anemiantes, enquanto o leucograma auxilia no diagnóstico de processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático. Assim, faz-se necessário o conhecimento dos parâmetros da espécie nos diferentes tipos de cultivo para o estabelecimento de um banco de dados confiável, uma vez que a composição sanguínea dos peixes pode ser influenciada por fatores bióticos (espécie, sexo, estágio de desenvolvimento gonadal, status nutricional, estresse, infecções, peso e comprimento corporal, nível de parasitismo) e abióticos (temperatura, quantidade de oxigênio dissolvido e gás carbônico, pH e sazonalidade) (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2009).

Em espécies nativas como o jundiá (*Rhamdia quelen*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pirarucu (*Arapaima gigas*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) várias alterações hormonais, metabólicas iônicas e hematológicas, em decorrência do estresse foram registradas (BARCELLOS et al., 2001; GOMES et al., 2003; GOMES et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2006; BRANDÃO et al., 2008; FAGUNDES e URBINATI, 2008; CARNEIRO et al., 2009; CHAGAS, 2010).

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm o pigmento respiratório, hemoglobina, que tem por função o transporte de oxigênio e gás carbônico por meio da combinação da hemoglobina com oxigênio formando oxihemoglobina, em órgãos respiratórios, ocorrendo posterior troca de CO₂ tecidual (RANZANI-PAIVA, 2007). Qualquer deficiência no eritrócito será traduzida por uma falta de O₂ nos tecidos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). A elevação do valor de hematócrito pode ser observada como resposta hematológica a eventos estressantes, para diversas espécies (BARTON e IWAMA, 1991), especialmente em relação à hipoxia.

Observações em relação ao hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos podem ser bons indicadores sobre a capacidade de transporte de oxigênio dos peixes, permitindo estabelecer relações com a concentração de oxigênio disponível no habitat de origem do animal (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2009).DUCCINI et al. (2004) relataram que alterações nos níveis de glicose estão relacionadas com o nível de atividade da espécie e do ambiente em que estão sendo cultivadas.

CAVERO et al., (2004) utilizaram a glicose plasmática como um indicador indireto de estresse em peixes e ressaltaram que os níveis aumentaram quando foram realizadas as práticas de rotina, como biometria e sifonagem, reduzindo-se à medida que, os peixes foram se adaptando às condições experimentais. Esses resultados demonstram que a glicose pode ser usada como indicador de estresse em peixes em condições adversas. No entanto, MARTINS et al. (2008), buscando encontrar a diferença no quadro hematológico e na resposta inflamatória aguda induzida em Tilápia do Nilo observaram o nível de glicose e não obtiveram diferença entre os tratamentos, o que, possivelmente, deve-se à adaptação dos animais às devidas condições experimentais.

Agentes estressores como: ectoparasitas, variações de temperatura, hipoxia, transporte, o tempo de exposição, método de exposição do patógeno e manuseio estão relacionados diretamente com a mobilização de energia endógena pelo peixe, ou seja, aumentos nos níveis de glicose sanguínea (URBINATI et al., 2004). A mobilização da glicose tem por objetivo fornecer energia extra para o animal resistir, durante o período de distúrbios (CAVERO et al., 2004).

O título aglutinante e a atividade antimicrobiana dos peixes podem constituir importantes parâmetros imunológicos, uma vez que alterações nestas atividades podem refletir condições de estresse provocadas por alterações ambientais, fisiológicas ou por infecções (NAYAK, 2010). Em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas intraperitonealmente contra *Aeromonas hydrophila* o título de aglutinação foi significativamente maior quando comparado a outras vias de aplicação. No mesmo estudo, o soro dos peixes de todos os tratamentos não apresentou atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* e *Enterococcus durans* (SILVA et al., 2009).

A resposta imunológica dos peixes pode sofrer efeitos inibitórios de estresse agudo ou crônico, causando significativa redução na sua resistência a doenças (BARTON e IWAMA, 1991; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; BARCELLOS et al, 2004). Por essa razão, o estresse é conhecido por aumentar a suscetibilidade do hospedeiro às doenças infecciosas. Isso tem sido documentado em peixes por MARTINS et al. (2008) que inocularam 1×10^6 UFC/mL de *Enterococcus* sp. em tilápia do Nilo e após 24 horas observaram aumento no hematócrito, do número de trombócitos e leucócitos totais, número de linfócitos e diminuição do número de monócitos, porém sem alterações no número de neutrófilos. GARCIA e MORAES (2009) ao infectarem pacu (*Piaractus mesopotamicus*) intraperitonealmente com 6×10^6 UFC/mL de *A. hydrophila* observaram após 24 horas, anemia normocítica-

hipocrômica, redução dos níveis de proteínas plasmáticas totais e globulinas, número de trombócitos, leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos, mas um aumento do número de neutrófilos e monócitos. A diferença nessas alterações entre os dois estudos pode ser devido à quantidade de bactéria inoculada, que foi 6 vezes maior em pacu que em tilápia do Nilo. Em carpa comum (*Cyprinus carpio*) infectadas com *Aeromonas hydrophila* foi descrita diminuição do hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos, acompanhada de leucocitose (HARIKRISHNAN et al., 2003).

As alterações dos padrões hematológicos e das variáveis imunológicas, bem como os distúrbios morfológicos de células do sangue podem ser utilizadas para avaliação prognóstica em peixes aos diferentes desafios do ambiente, principalmente de cultivo, visto que estas alterações ocorrem em resposta aos danos causados por agentes agressores (SATAKE et al., 2009).

Probióticos e o sistema imune

Com o desenvolvimento dos cultivos intensivos e consequente aumento da produção, surge à necessidade de alternativas para o controle de enfermidades. O uso de antibióticos no tratamento de patologias bacterianas na aquicultura deve ser limitado a fim de se reduzir a disseminação de resistência aos mesmos em bactérias patogênicas ou da microbiota dos peixes e, dessa forma, representar risco para saúde pública e ao meio ambiente (CHANG e LIU, 2002; NAYAK, et al., 2007), além do elevado custo e efeito marginal (GARCIA, 2008). As restrições ao uso de antimicrobianos, mediante imposições legais, aliadas a maior conscientização quanto à necessidade de garantir produtos saudáveis e inócuos ao consumidor final (BALCÁZAR et al., 2006; NAYAK, et al., 2007).

Uma das soluções adotadas para controlar o aparecimento de microrganismos patogênicos em ambientes de cultivo, além de permitir a redução do uso de antibióticos, foi o desenvolvimento de microrganismos com atividade antagonista àqueles patogênicos, os microrganismos probióticos. (BALCÁZAR et al., 2008; GATESOUBE, 2008; KESARCODI-WATSON et al., 2008; TINH et al., 2008).

Os probióticos são microrganismos fornecidos na alimentação de capazes de colonizar e se multiplicar na microbiota intestinal do hospedeiro resultando em melhoria nas condições envolvidas nos processos de digestão e absorção dos nutrientes e com função de

imunomodulação dos sistemas biológicos e prevenção de doenças em peixes (VERSCHUERE et al., 2000; BURR et al., 2007).

Entretanto para que exista esta colonização é necessária a aplicação constante e frequente do probiótico. Assim, os microrganismos que estiverem presentes em maior quantidade influenciarão a microbiota do intestino do hospedeiro. Após a instalação definitiva de uma microbiota no ambiente, somente altas doses de probióticos provocarão sua colonização artificial, a qual será apenas temporariamente dominante (FULLER, 1992; NAYAK, 2010).

A utilização de probióticos no cultivo de organismos aquáticos está aumentando devido à maior necessidade de manejos mais ecologicamente corretos, na tentativa de evitar a utilização excessiva de antibióticos (GATESOUBE, 1999; SAHU et al., 2008). Espécies probióticas têm inibido bactérias patogênicas tanto *in vitro* e *in vivo* por diferentes mecanismos. Os probióticos atuam inibindo a proliferação de bactérias patogênicas pela produção de componentes inibitórios como as bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, proteases, peróxido de hidrogênio, formação de amônia e diacetil, ácidos orgânicos e ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiónico, acético, butírico, láctico), alteração nos valores de pH, competição por nutrientes, podem estimular a produção do linfócito B, sítios de adesão e enzimas que resultam no melhoramento nutricional do cultivo animal. A adição direta de material orgânico dissolvido mediado pelas bactérias modulam interações com o ambiente e o desenvolvimento de respostas imunes benéficas (GÓMEZ et al., 2007).

Através da produção do ácido láctico, provocam uma redução no pH intestinal, tornando o meio impróprio para a multiplicação dos agentes patogênicos. As bactérias produtoras de ácido láctico podem estimular a produção de anticorpos e a atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do corpo (NAYAK, 2010).

Estudos sobre o uso dos probióticos na aquicultura em diversas espécies de peixes e crustáceos de interesse econômico e seus efeitos sobre o desempenho e sanidade podem ser encontrados em revisões sobre o assunto realizado por IRIANTO e AUSTIN (2002), KESACORDI-WATSON et al. (2008), WANG et al. (2008) e NAYAK (2010).

Entre os efeitos benéficos dos probióticos, a modulação do sistema imunológico é um dos principais efeitos relatados em estudos. Os probióticos podem interagir com as células do sistema imunológico, tais como células fagocíticas mononucleares (monócitos, macrófagos), e

leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células NK para melhorar as respostas imunes inatas (KUMAR et al., 2008).

A atividade fagocítica é responsável pela ativação precoce da resposta inflamatória antes da produção de anticorpos e desempenha um papel importante na defesa antibacteriana. Muitas bactérias com potencial probiótico são isoladas de peixes, tais como *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus* para inibir bactérias patogênicas e colonizar o trato intestinal e promover resposta inespecífica do sistema imune com a estimulação da atividade fagocitária (MEURER et al., 2006; ALY et al., 2008; JATOBÁ et al., 2008).

Estudos em relação ao processo conhecido como “burst” respiratório em tratamentos utilizando probióticos são muito insipientes e muitas vezes contraditórios (DIAZ-ROSALES et al., 2009; SHARIFUZZAMAN e AUSTIN, 2009).

A lisozima é uma importante enzima bactericida da imunidade inata e indispensável aos peixes contra agentes infecciosos. Alguns estudos relatam o aumento do nível de lisozima na mucosa da pele e soro em peixes suplementados com probióticos (KIM e AUSTIN, 2006; SONG et al., 2006; TAOKA et al., 2006). Os probióticos podem induzir a transcrição da lisozima em várias células diretamente pela combinação de receptores ou indiretamente por indução de citocinas. Como os macrófagos são as mais prováveis células primárias secretoras de lisozima em peixes, o rim anterior é provavelmente o principal órgão secretor de lisozima (NAYAK, 2010).

Em teleósteos, o sistema complemento desempenha importante papel na resposta imune inata e adaptativa, e as proteínas deste sistema também estão envolvidas na quimiotaxia, opsonização, fagocitose e degradação de agentes patogênicos. Os probióticos podem auxiliar o sistema complemento e assim promover respostas imunes efetivas contra agentes infecciosos (PANIGRAHI et al., 2005; WANG et al., 2008).

As citocinas são mediadores da proteína produzida por células do sistema imunológico e contribuem para o crescimento e diferenciação celular e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Estudos indicam que os probióticos podem efetivamente modular a produção de citocinas antes da inflamação (PEDDIE et al., 2002).

O sistema imunológico do intestino é conhecido como tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e que os probióticos e seus componentes interagem e podem afetar de maneira benéfica as células imunes, como os leucócitos. No intestino, os microrganismos probióticos realizarão uma rápida metabolização de substratos (açúcares,

vitaminas, aminoácidos, proteínas), tornando-os indisponíveis aos patógenos e, por consequência, impedindo a proliferação destes (PICCHIETTI et al., 2007).

Alguns autores sugerem que cepas bacterianas isoladas do intestino de juvenis da própria espécie ou do ambiente, possuem ótimo potencial para ser utilizado como probiótico, devido à atividade antimicrobiana natural ou atuando como imunomoduladores, podendo prevenir infecções e enfermidades nos cultivos, além de apresentar adaptabilidade muito maior às condições intestinais (resistência a sais biliares, baixos pHs e proteases) (VINE et al., 2004; RAMIREZ, 2005; KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Os probióticos apresentam efeitos na maturação, alevinos, juvenis e adultos, para diversas espécies (RINGO e GATESOUBE, 1998). Nos últimos anos, diversos trabalhos demonstram sua capacidade de melhorar o sistema imune e desempenho zootécnico para uma única espécie cultivada (GILL e RUTHERFURD, 2001; NEWAJ-FYZUL et al., 2006; ALY et al., 2008; JATOBÁ et al., 2008; KUMAR et al., 2008), promovem uma melhora no ganho de peso, conversão alimentar e aproveitamento dos nutrientes da ração, além de beneficiar o ambiente de cultivo com a melhoria da qualidade de água (GATESOUBE, 1999; BALCÁZAR et al., 2006; WANG et al., 2008). A melhoria da qualidade de água pode estar associada à presença de bactérias Gram positivas, pois estas convertem a matéria orgânica em CO₂ de forma mais eficiente do que as bactérias Gram-negativas. Durante o ciclo de produção, altos níveis de bactérias Gram-positivas na água podem minimizar o acúmulo de carbono orgânico dissolvido (NAYAK, 2010). As bactérias lácticas adicionadas à ração de maneira profilática podem ainda beneficiar a aquíicultura, principalmente nas fases iniciais do cultivo, quando os peixes estão mais susceptíveis a doenças (PORTZ, 2006).

Entre os microorganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*) e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Leuconostoc* spp. podendo ser encontradas na microbiota de peixes saudáveis (NAYAK, 2010). Apesar dos testes já realizados, a ação antagonista e mecanismo de colonização destas bactérias não foram satisfatoriamente esclarecidos, sendo necessários novos desafios, especialmente *in vivo*, para um melhor entendimento (GATESOUBE, 1999).

KUMAR et al. (2006) observaram maior sobrevivência em carpa *Labeo rohita* alimentada com *Bacillus subtilis*, submetida à injeção intraperitoneal com *Aeromonas hydrophila*. PANIGRAHI et al. (2005) observaram o efeito da dieta do probiótico *Lactobacillus rhamnosusem* em truta, *Oncorhynchus mykiss*, relatando a indução do sistema imune. KUMAR et al. (2008) ressaltaram que o uso de bactéria *Bacillus subtilis* aumenta a resposta imune dos peixes. JATOBÁ et al. (2008) isolaram bactérias ácido-láticas do intestino de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* e observaram seu efeito probiótico e a melhora do sistema imune após uma infecção experimental contra *Enterococcus* sp. Além disso, a adição de *Lactobacillus plantarum* na ração de tilápia provocou aumento no número de neutrófilos e potencializou a migração de células para a bexiga natatória após inflamação induzida com carragenina (DOTTA et al., in press).

De acordo com VINE et al. (2004), a seleção de probióticos para a aquíicultura é usualmente baseada no antagonismo entre microrganismos e agentes patogênicos. Estes mesmos autores ainda salientam que esta seleção pode ser realizada através de outros critérios como: o gênero ao qual pertence à bactéria, a estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente o trato gastrointestinal, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos a ser metabolicamente ativo no intestino (COLLINS et al., 1998; SAARELA et al., 2000). VINE et al. (2006) propuseram um protocolo para a seleção de microrganismos probióticos isolados a partir do próprio organismo hospedeiro que está sendo, ou se pretende cultivar. Apesar de não haverem evidências demonstrando que probióticos isolados do próprio organismo hospedeiro apresentam um melhor desempenho quando comparados com os probióticos isolados de espécies ou ambientes diferentes, supõem-se que os riscos apontados acima são consideravelmente menores.

Os mecanismos pelos quais os probióticos afetam o sistema imunológico ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns fatores como a origem e a fonte de probióticos, a viabilidade, a dose e a duração da suplementação podem regular sua atividade. Não há dúvidas que os probióticos podem estimular o sistema imunológico, mas a dose inadequada e/ou duração da suplementação de probióticos, cinética da dose e método de administração em relação aos peixes são os fatores críticos que podem regular a resposta imune destes animais (BALCÁZAR et al., 2006; NAYAK, 2010).

A dose de probióticos ministrada pode ser um fator limitante nos hospedeiros, dependendo da concentração, podendo afetar o crescimento e proteção contra enfermidades, além de influenciar na atividade de imunomodulação. Na aquíicultura, a dose de probióticos varia de 10^{6-10} UFC/g de ração. Portanto, a dose ideal a ser ministrada deve ser adequada à espécie (hospedeiro) e ao tipo de parâmetro imunológico que se pretende analisar, já que doses insuficientes podem não demonstrar o real efeito sobre o sistema imunológico enquanto que altas doses podem exercer efeitos deletéreos na saúde dos hospedeiros (NIKOSKELAINEN et al., 2001).

A duração dos probióticos na alimentação é outro fator importante que pode afetar a resposta imune dos peixes. Na maioria dos peixes, os efeitos benéficos tais como ganho de peso, imunidade e melhora da resistência a doenças foram registrados em dietas suplementadas durante 1-10 semanas. O tempo ideal para indução da resposta imune difere com relação ao probiótico e também o tipo de parâmetro imunológico. Da mesma forma, a diferença no parâmetro específico imunológico também é dependente do tempo de duração da alimentação (CHOI e YOON, 2008). Apesar de alguns pesquisadores acreditarem que o regime alimentar utilizando probióticos por muito tempo não é necessário, o regime alimentar curto pode ocasionar um declínio acentuado da resposta imune de peixes (PANIGRAHI et al., 2005). Este tipo de declínio pode estar ligado ao insucesso das cepas probióticas para se estabelecer e se multiplicar na microbiota dos peixes. Embora um regime alimentar muito longo é vantajoso para o hospedeiro em muitos aspectos, são necessários mais estudos para estabelecer os efeitos benéficos do regime de curta duração (NAYAK, 2010).

A eficiência dos probióticos depende do sucesso da colonização no trato intestinal. Vários fatores podem influenciar o estabelecimento e atividade dos probióticos como parâmetros de qualidade de água (dureza, oxigênio dissolvido, temperatura, pH, pressão osmótica, fricção mecânica) (DAS et al., 2008) e estresse devido principalmente as elevadas densidades de estocagem, encontradas nos cultivos intensivos (MEHRIM, 2009).

Estudos sobre os efeitos da suplementação de probióticos em aquíicultura com intuito de aumentar a resistência às doenças e melhorar o sistema imune dos peixes ainda são promissores e muitas vezes de difícil interpretação, já que os benefícios da utilização nem sempre são evidentes. Isto pode ocorrer devido às variáveis do ambiente em que os animais estão expostos e fatores intrínsecos que podem afetar o desempenho destes animais, mascarando a atividade do probiótico.

A influência dos mecanismos de ação e proteção imunológica proporcionada pela suplementação dos probióticos, ainda não estão bem esclarecidos, surge à necessidade de estudos mais aprofundados. O desenvolvimento de alternativas para o controle e prevenção de doenças em piscicultura deve servir como ferramenta para diminuir as mortalidades atribuídas a agentes infecciosos, já que o conhecimento acerca da utilização dos probióticos pode contribuir com a melhora do desempenho zootécnico e resistência dos animais, além de não comprometer o meio ambiente. A proposta deste estudo foi contribuir com as pesquisas na área de sanidade animal, buscando ampliar o conhecimento sobre a utilização de probióticos em aquíicultura principalmente em relação a espécies nativas, como o jundiá.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação de probiótico *Leuconostoc lactis* sobre as respostas hemato-imunológicas de jundiás infectados com *Aeromonas hydrophila*

Objetivos Específicos

- Isolar e selecionar bactérias ácido-láticas do trato intestinal de jundiás;
- Testar o potencial de utilização de bactérias ácido-láticas como probióticos adicionadas na ração de jundiás;
- Verificar a influência da suplementação das bactérias ácido-láticas adicionadas na ração de jundiás sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos antes e após infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*.

“Suplementação alimentar com bactérias lácteas sobre alguns parâmetros hemato-imunológicos de jundiá (*Rhamdia quelen*) infectado experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*”

Giselle Mari Speck^a, Adolfo Jatobá^b, Gabriela Tomas Jerônimo^a, Bruno Côrrea Silva^b, Fabíola Santiago Pedrotti^c, José Luis Pedreira Mourinho^b, Maurício Laterça Martins^{a*}

(^a) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aqüicultura, Laboratório de Pesquisas em Sanidade de Organismos Aquáticos, Rodovia SC 404, Km 3, CEP 88040-900 Florianópolis, SC. E-mail: giselle_speck@yahoo.com.br, gabrielatj@hotmail.com, mlaterca@cca.ufsc.br

(^b) (UFSC), Departamento de Aqüicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Beco dos Coroaas, Barra da Lagoa, CEP 88062-601 Florianópolis, SC. E-mail: adjatoba@yahoo.com.br, bcs85@hotmail.com, morino@lcm.ufsc.br

(^c) (UFSC), Departamento de Aqüicultura, Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Rodovia SC 406 Km 3, CEP 88066-000 Florianópolis, SC. E-mail: fabiolapedrotti@hotmail.com

RESUMO

A resistência dos peixes ao desafio de microrganismos é influenciada pelos mecanismos de resposta imunológica. A maioria dos estudos sobre a resposta imune inata de peixes baseia-se apenas nos efeitos de dietas suplementadas com imunostimulantes. Em aqüicultura, apenas alguns estudos correlacionam os efeitos da suplementação dos probióticos, especialmente envolvendo espécies nativas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos e a suscetibilidade do jundiá *Rhamdia quelen* a infecção da bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*, após a suplementação ou não com probiótico na dieta. Os probióticos testados foram *Leuconostoc lactis*, Q2 (não identificado) e *Lactobacillus plantarum* isolados e selecionados do trato intestinal de jundiás e tilápias, respectivamente, com a capacidade de colonizar e inibir possíveis patógenos *in vitro* e *in vivo*. A cepa que apresentou o melhor desempenho foi utilizada no ensaio *in vivo*. O experimento consistiu de seis tratamentos com três repetições cada: Grupo A: Peixes alimentados com ração não suplementada com probiótico: T1 – Peixes não injetados (NiC); T2 – Peixes injetados com 1mL de solução salina estéril 0,65% (SaC) e T3 – Peixes injetados com 1×10^7 CFU/mL de *Aeromonas hydrophila* diluída em 1mL de solução salina esterilizada (AerC). Grupo B: Peixes

alimentados com ração suplementada com probiótico: T4 – Peixes não injetados (NiP); T5 – Peixes injetados com 1mL de solução salina estéril 0,65% (SalP) e T6 – Peixes injetados com 1×10^7 CFU/mL de *Aeromonas hydrophila* diluída em 1mL de solução salina esterilizada (AerP). Vinte quatro horas após as injeções, os peixes foram anestesiados com benzocaína e o sangue coletado. Os parâmetros examinados incluíram as contagens totais de eritrócitos (RBC), de leucócitos (WBC) e de trombócitos, o percentual de hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, atividade aglutinante e antimicrobiana do soro dos peixes contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. A utilização de *Leuconostoc lactis* como probiótico na dieta promoveu a colonização do intestino de jundiás, mas não influenciou os parâmetros hemato-imunológicos quando comparado ao tratamento controle. Como perspectivas futuras, propõe-se a realização de ensaios *in vivo* e *in vitro* para verificar a possível atuação das bactérias probióticas isoladas como inibidoras de bactérias patogênicas ou na melhoria do sistema imunológico e desempenho zootécnico.

ABSTRACT

The resistance of fish to microorganisms challenge depends mainly on the efficacy of the immune response. Most studies on the natural immune response of fish have focused on the effect of diets and immunostimulants. Few studies correlated the effects of probiotics supplementation in aquaculture, especially involving native fish species. Thus, this study aimed to investigate the modulation of some hemato-immunological parameters and susceptibility of silver catfish *Rhamdia quelen* to *Aeromonas hydrophila* infection, after fed or not probiotic supplemented diet. The experimental probiotics tested were *Leuconostoc lactis*, Q2 (unidentified) and *Lactobacillus plantarum*, isolated and select from the gastrointestinal tract of silver catfish and Nile tilapia, respectively, evaluating the capacity to colonize and inhibit possible pathogens *in vitro* and *in vivo*. The kind which that showed the best performance was utilized in the *in vivo* test. The experiment consisted of six treatments in triplicates: Group A: Fish fed unsupplement diet: T1 - non injected fish (NiC); T2 - fish injected with 1 mL of sterile saline solution 0.65% (SalC) and T3 - fish injected with 1×10^7 and 10^7 CFU/mL of *Aeromonas hydrophila* diluted in 1 mL sterile saline (AerC). Group B: Fish fed probiotic supplemented diet: T4 - non injected fish (NiP), T5 - fish injected with 1 mL of sterile saline solution 0.65% (SalP) and T6 - fish injected with 1×10^7 CFU/mL of

Aeromonas hydrophila diluted in 1 mL sterile saline (AerP). Twenty-four hours after injection, the fish were anesthetized and the blood collected. The examined parameters were: red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts, hematocrit, number of total thrombocytes, differential counting of WBC, agglutinating titer and antimicrobial activity of the serum against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The use of *Leuconostoc lactis* as probiotic in diets for silver catfish resulted in intestine settling with no effect in the hemato-immunological parameters, when compared to all groups. These results suggested that the search for alternatives as probiotic bacteria may be performed.

1. INTRODUÇÃO

A aquíicultura é o ramo da pecuária brasileira com o maior crescimento atualmente, tendo apresentado um desenvolvimento bastante significativo principalmente na última década (FAO, 2009). Comumente a este avanço, surgiu à necessidade de intensificar a produção e implantar novas técnicas de manejo a fim de acompanhar a demanda por um pescado de qualidade. No entanto, diante do grande número de espécies e híbridos de peixes que estão sendo cultivados, a participação das espécies nativas na piscicultura nacional ainda é modesta (Kubitza et al., 2007).

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Siluriforme: Heptapteridae) é um peixe nativo da América Latina, amplamente distribuída nas bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (Zaniboni-Filho, 2004; Froese e Pauly, 2009). Esta espécie é considerada promissora por grande parte dos produtores de peixes em função de apresentar rápido crescimento, fácil manejo, além de uma ampla aceitação do mercado consumidor. Entretanto, quando em cultivo comercial, o jundiá é submetido a situações de estresse pelas condições ambientais desfavoráveis ou durante o período reprodutivo, ocasionando alta suscetibilidade a infecções bacterianas por *Aeromonas hydrophila* (Barja e Estevez 1988; Kirkan et al., 2003) que conseqüentemente comprometem sua imunidade e são responsáveis por grandes perdas dos produtores acarretando entraves na produção comercial da espécie (Brandão, 2004; Borba et al., 2007).

A enfermidade causada por esta bactéria pode comprometer as brânquias, tegumento e intestino de exemplares perfeitamente saudáveis, sendo especialmente abundantes em águas com qualidade alterada, especialmente com baixos níveis de oxigênio e altos níveis de matéria

orgânica e poluentes (Merino et al., 1995; Kirov et al., 2002; Who, 2004; Figueiredo et al., 2008). Estas bactérias são Gram negativas e tipicamente oportunistas, organismos patogênicos facultativos, e manifestam-se em hospedeiros enfraquecidos e atacados por outros agentes etiológicos. São, portanto considerados invasores secundários que se estabelecem em condições particulares, se instalam rapidamente e se desenvolvem ao mesmo tempo em que outras infecções, sendo estas exacerbadas pelo desenvolvimento de *Aeromonas*, que são geralmente a causa última da morte do hospedeiro (Pavanelli et al., 2002; Figueiredo et al., 2008). Os sinais clínicos de infecção podem variar de lesões de pele, superficiais ou profundas, a quadros típicos de septicemia. As lesões de pele podem se apresentar como áreas de hemorragia e necrose de extensão variada, que podem progredir para úlceras que acometem geralmente o tecido muscular. Nos quadros de infecção sistêmica são observados a exoftalmia, abdômen distendido contendo líquido serosanguinolento e presença de petéquias hemorrágicas nas vísceras (Pavanelli et al., 2002).

Organismos com sistema imune comprometido são vulneráveis a infecções bacterianas e nesses casos é comum a antibioticoterapia. Entretanto, como estratégia tradicional de tratamento de infecções, os antibióticos são alvos de críticas, pois o uso inadequado tem elevado potencial para desenvolver bactérias resistentes e para destruir a microbiota ambiental, além do elevado custo e efeito marginal (Garcia, 2008).

Existe, assim, uma crescente necessidade de se desenvolver meios de prevenção e controle de bacterioses, através do monitoramento das condições sanitárias dos animais e do ambiente de cultivo. Neste contexto, um maior conhecimento do sistema imune dos peixes e o estabelecimento dos padrões hemato-imunológicos de referência, podem certamente trazer uma importante contribuição para o monitoramento de seu estado de saúde e conseqüentemente para a prevenção e controle de enfermidades, e contextualizam a relevância de estudos sobre probióticos (Nayak et al., 2007).

Os probióticos podem ser alternativos ao uso dos antibióticos e para o controle de enfermidades bacterianas contribuindo com o desenvolvimento de microrganismos benéficos no trato gastrintestinal (TGI), resultando em melhoria nas condições envolvidas nos processos de digestão e absorção dos nutrientes (Balcázar et al., 2006; Gatesoupe, 2008; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Tinh et al., 2008).

Segundo Verschuere et al. (2000), probiótico é um adjunto microbiano vivo que tem efeito benéfico sobre o hospedeiro, ao

modificar a comunidade microbiana do ambiente ou associada ao hospedeiro, assegurando uso melhorado do alimento ou aumentando seu valor nutricional, ao acentuar a resposta do hospedeiro a doenças, ou ao aumentar a qualidade de seu ambiente imediato. Com base nessa definição, probióticos podem incluir adjuntos microbióticos que impedem patógenos de se proliferarem no trato intestinal, nas estruturas superficiais, e no ambiente da espécie cultivada que asseguram o uso ótimo da alimentação ao auxiliar na digestão. Um dos principais desafios em se obter bactérias probióticas é usar métodos de seleção e colonização apropriados. Uma seleção criteriosa por bactérias probióticas deverá avaliar os métodos de colonização, a capacidade de competição contra patógenos e crescimento imunoestimulatório eficiente em peixes (Nayak, 2010).

Vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles as bactérias ácido lácticas, bactérias não ácido-lácticas e leveduras (Coppola e Turnes, 2004). Na aquicultura, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas têm sido os principais alvos de pesquisa para o uso de probióticos (Irianto e Austin, 2002). Bactérias ácido lácticas Gram-positivas tal como *Leuconostoc lactis*, isolada do trato intestinal de jundiás, oferecem uma alternativa a terapia antibiótica para a piscicultura. O gênero *Leuconostoc* engloba bactérias não formadoras de esporos, produtoras das enzimas catalase e oxidase negativa, além de serem bastante tolerantes às variações ambientais e produzem ácido láctico como principal ou único produto do metabolismo fermentativo. São bactérias muito exigentes do ponto de vista nutricional, requerendo inúmeros substratos para sua sobrevivência. (Nayak, 2010). Apesar dos estudos já realizados, a ação antagonista e o mecanismo de colonização desta bactéria no desempenho e resistência a infecção por patógeno em jundiás não foram satisfatoriamente esclarecidos, sendo necessários novos desafios, especialmente *in vivo*, para um melhor entendimento dos efeitos probióticos.

Desta forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de isolar, selecionar, avaliar a colonização de bactérias ácido lácticas do trato intestinal de jundiá e avaliar os parâmetros hemato-imunológicos após o desafio experimental com *Aeromonas hydrophila* destes animais alimentados com ração suplementada com bactérias ácido-lácticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Peixes juvenis de água doce, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard 1824, Siluriforme: Heptapteridae), aparentemente saudáveis e sem lesões, foram obtidos da Fundação Municipal para o Desenvolvimento Rural 25 de Julho (FMDR 25 de julho), localizada na região Norte de Santa Catarina, no Distrito de Pirabeiraba, município de Joinville (Latitude 26° 18' 14" Sul e Longitude 48° 50' 45" Oeste) no período de abril a dezembro de 2009. Foram utilizados nos diferentes ensaios um total de 143 jundiás juvenis (20,04±8,03 a 79,50±26,10 g de peso médio e 13,16±1,53 a 20,7±1,73 cm de comprimento médio total), pertencentes à Bacia Hidrográfica de Itapocú (Latitude 26° 11' e 26° 32' Sul e Longitude 48°38' e 49° 31' Oeste). Os animais foram transportados para o Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos do Departamento de Aquicultura da UFSC e mantidos em tanques de 100L. A água do tanque foi mantida sob controle de temperatura, através de termostato e aquecedor, de aeração e filtro biológico. Para manter o equilíbrio eletrolítico e prevenção no surgimento de patologias, o tanque foi mantido com 0,2% de NaCl/L. A qualidade da água dos tanques foi monitorada diariamente, sendo que foram analisados oxigênio dissolvido, temperatura (Oxímetro digital "AT-130" - Alfakit), pH (pHmetro "AT-300" - Alfakit), e as concentrações de amônia, nitrito e nitrato (Kit de amônia água doce - Alfakit). Aproximadamente 50% da água dos tanques foi renovada diariamente.

2.2. Ensaio *in vitro*

2.2.1. Isolamento de bactérias ácido-láticas

Juvenis saudáveis de jundiá (16,65 ± 3,59 g, n = 11), sem sinais clínicos de doenças parasitárias, permaneceram em um tanque por 10 dias. Foram submetidos ao jejum de 24 h, para esvaziamento intestinal, antes de serem sacrificados

O isolamento das bactérias ácido-láticas foi realizado através da adaptação dos métodos descritos por Ramírez et al. (2006). Os exemplares foram dissecados assepticamente, sendo o trato intestinal removido rapidamente e enxaguado com solução salina estéril (0,65%) externamente e internamente (lúmen intestinal). Cada amostra foi homogeneizada com solução salina estéril (1:1; peso/volume), diluída

serialmente (1:10 em solução salina estéril), e 100 mL das diluições de 10^{-1} a 10^{-3} foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco) com 2% de NaCl, e 0,1% de azul de anilina como indicador (colônias de bactérias ácido-láticas crescem azuis). As placas foram incubadas por 48h a 35°C em estufa. As colônias crescidas foram isoladas por método de esgotamento em novas placas de Petri, com meio de cultura Agar MRS.

2.2.2. Seleção *in vitro* de bactérias isoladas do intestino de jundiás

As cepas foram selecionadas e classificadas, de acordo com a morfologia das colônias viáveis, pelo método de coloração de Gram, teste de antagonismo frente à patógenos e crescimento *in vitro*. A cepa que apresentou melhor desempenho foi avaliada quanto à patogenicidade, colonização e inibição do crescimento *in vivo* de bactérias patogênicas no trato digestório de juvenis de jundiá. Os patógenos utilizados foram *Vibrio alginolyticus* (BCCM 2068), *Vibrio anguillarum* (ATCC 19264), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (D363), *Micrococcus luteus* (A270), e *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715).

2.2.3. Antagonismo frente à patógenos

Neste teste qualitativo, foi utilizada a técnica de halo de difusão para verificar a atividade antibacteriana das bactérias ácido-láticas frente à patógenos. Este método é utilizado para averiguar o potencial antimicrobiano *in vitro* das candidatas probióticas (Hjelm et al., 2004). Segundo Vaseeharan e Ramasamy (2003), atividade antibacteriana é definida como a zona inibitória de crescimento formada ao redor do disco embebido com cultura bacteriana em teste (candidatas probióticas).

Cada cepa isolada de bactéria ácido-láctica foi incubada em 10 mL de meio de cultura MRS líquido a 35°C por 48 h em agitação contínua. Posteriormente, a cultura foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura Agar MRS, com inóculo de 1×10^7 UFC mL⁻¹, e incubado por 48 h a 35°C. Passado este período, foram retirados discos de 0,8 cm de diâmetro do meio de cultura Ágar MRS contendo as bactérias ácido-láticas e sobrepostas na superfície do meio Agar Triptona de Soja (TSA, Difco), recém semeado com 100 µL de solução contendo 10^7 UFC mL⁻¹

das cepas de bactérias patogênicas mencionadas no item anterior (2.2.2) e incubadas por 24 h a 35°C.

A inibição foi observada através da produção de um halo inibitório de crescimento das bactérias patogênicas ao redor dos discos com meio de cultura Agar MRS impregnados com as bactérias ácido-láticas. A cepa que apresentou os maiores halos de inibição *in vitro* frente à patógenos foi identificada bioquimicamente com o kit API 50 CHL e selecionada para o ensaio de colonização do trato intestinal de jundiás, via suplementação na dieta. As cepas identificadas e selecionadas para a colonização foram às bactérias probióticas *Leuconostoc lactis* (Q11) e Q2 (não identificada).

2.3. Ensaio *in vivo*

2.3.1. Avaliação das cepas selecionadas como probiótico através da sua colonização do trato intestinal de jundiás

Para a colonização do trato intestinal, foram utilizados 24 jundiás (79,5 ± 2,6 g) distribuídos em 8 tanques na proporção de 3 peixes por tanque. Os peixes foram aclimatados por 5 dias e submetidos a quatro tratamentos, em delineamento inteiramente ao acaso, em duplicata, por um período de 20 dias. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, correspondendo a 5% da biomassa, com ração comercial seca, sem presença de bactérias ácido-láticas, como controle, e suplementada, nos demais tratamentos, com cultura de *Leuconostoc lactis* sp. e Q2 (não identificada) (isoladas do trato intestinal de jundiá) e *Lactobacillus plantarum* CPQBA-007-07 isolada do trato intestinal de tilápia do Nilo.

Durante o período experimental foi verificada, diariamente, a ocorrência de mortalidade ou de sinais clínicos típicos de alguma enfermidade.

2.3.2. Preparo da dieta suplementada com bactérias isoladas de jundiás

A ração comercial extrusada, 38% de proteína bruta (Nutri), foi suplementada através da aspersão de 100 mL de inóculo de culturas bacterianas (*Leuconostoc lactis*, Q2 e *Lactobacillus plantarum* (1x10⁷ UFC mL⁻¹) crescidas previamente em meio líquido MRS por quilograma de ração. A dieta controle foi aspergida com o mesmo meio líquido, sem adição de bactérias. Após aspersão, as dietas foram mantidas em estufa a

35°C por 24 h, hermeticamente fechadas para o crescimento bacteriano (melhor colonização do pellet). Posteriormente, a ração foi mantida na estufa para secagem a 35°C por 24 h e, finalmente, conservadas sob refrigeração a 4°C, durante o período experimental. A concentração de bactérias ácido-láticas viáveis na dieta foi estimada no início do experimento através de plaqueamentos em meios sólidos (Ramírez et al., 2006). Para isto, 1 g de ração foi triturado e homogeneizado com solução salina estéril (1:1; peso/volume), diluído serialmente (1:10 em solução salina estéril) e 100 mL das diluições de 10^{-3} a 10^{-7} foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura Agar MRS com 2 % de NaCl, suplementado com 0,1% de azul de anilina como indicador, e incubados por 48h a 35°C através da adaptação dos métodos descritos por Ramírez et al. (2006).

Para a infecção experimental, a dieta experimental foi preparada utilizando a mesma metodologia acima, com a bactéria ácido-lática *Leuconostoc lactis* (isoladas do trato intestinal de jundiá) e incorporado na ração à uma concentração de 1×10^7 UFC mL⁻¹.

2.3.3. Avaliação da microbiota do trato intestinal dos jundiás

Após os 20 dias do início do período experimental, foi realizada a coleta dos jundiás, com a finalidade de verificar a colonização das bactérias ácido-láticas, fornecidas através da dieta, e a população de *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias totais. Para a coleta, os animais permaneceram 24h em jejum antes da amostragem para esvaziamento intestinal. Os tratos intestinais foram macerados e semeados, conforme metodologia descrita descritos por Ramirez et al. (2006), em meio MRS com 2% de NaCl com pH ajustado para 5,5, suplementado com 0,1% de azul de anilina (meio seletivo para o crescimento de bactérias ácido-láticas), e também em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Tiosulfato Citrato Bil Sacarose (TCBS, Difco – seletivo para o crescimento de *Vibrio* spp.) e incubadas a 35°C por 24h, para posterior contagem de colônias totais viáveis em placas com meio TCBS e Agar MRS.

2.3.4. Preparo do inóculo

As colônias de *Aeromonas hydrophila* utilizadas eram provenientes do Setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos, retiradas de exemplares de *Oreochromis niloticus* com sinais clínicos característicos de septicemia hemorrágica.

O inóculo bacteriano contendo foi incubado em tubos de ensaio com meio de cultura líquido Brain Heart Infusion Broth (BHI) a 30°C por 24h. Após este período, centrifugado por 30 min a 1800 x g e o precipitado ressuspensão em 10mL de SSE. Para a contagem de bactérias presente no inóculo, foram realizadas 5 diluições seriadas fator 1:10, semeadas em placas contendo meio de cultura TSA, para nova diluição em SSE objetivando atingir a concentração 1×10^7 UFC/mL de *Aeromonas hydrophila*.

2.3.5. Infecção experimental

Foram utilizados 108 jundiás ($22,6 \pm 2,6$ g), distribuídos em dois tanques-rede de $4,8 \text{ m}^3$ dispostos em dois viveiros de 136 m^3 na proporção de 54 peixes por tanque-rede, de modo que não houvesse influência da alimentação entre os tanques-rede. Após este período os peixes foram transportados ao laboratório e permaneceram por mais três dias, em 18 tanques, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento: (1) ração não suplementada e peixes não injetados (NiC); (2) ração suplementada com 1×10^7 UFC de *Leuconostoc lactis*/g de ração e peixes não injetados (NiP); (3) ração não suplementada e peixes injetados com 0,1mL de SSE 0,65% (SalC); (4) ração suplementada e peixes injetados com SSE (SalP); (5) ração não suplementada e peixes injetados com 1×10^7 UFC de *Aeromonas hydrophila* dissolvidos em 0,1mL de SSE (AerC); (6) ração suplementada e peixes injetados com *Aeromonas hydrophila* (AerP).

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, durante 25 dias, com ração controle ou suplementada com a cepa de bactéria ácido-lática. Após este período, deixados 24h de jejum para a experimentação e coleta das amostras 24h após as injeções de salina ou bactéria.

2.3.6. Observação de sinais clínicos

Diariamente os animais foram cuidadosamente examinados para o diagnóstico de eventuais alterações clínicas, tais como septicemia hemorrágica, petéquias localizadas na superfície corporal, lesões ulcerativas, corrosão das nadadeiras, exoftalmia, opacidade da córnea e distensão abdominal por ascite (Kirov et al., 2002; Kubitzka, 2005; Barcellos et al., 2008). Também foram feitas observações de alterações comportamentais, morbidade e mortalidade.

2.3.7. Análise hematológica

Vinte quatro horas após a infecção experimental procedeu-se a coleta sanguínea. Após a biometria, os animais foram anestesiados com benzocaína (50mg/L) até a perda do equilíbrio e redução dos movimentos operculares (Baldisserotto, 2004).

Foram retirados aproximadamente 2,0 mL de sangue por punção do vaso caudal com auxílio de seringas contendo EDTA 10% e com seringas sem anticoagulante (Comissão de Ética – CEUA nº 23080.006733/2008-76). Para a obtenção de soro, o sangue sem anticoagulante permaneceu em temperatura ambiente para coagulação, e após duas horas a 25° C foi centrifugado em 1400 x g, por 10 min e, após separação, foi armazenado a 20°C negativos até o dia da análise. Este soro foi utilizado para determinação do título aglutinante, atividade antimicrobiana. Uma alíquota do soro foi utilizada para determinação do índice glicêmico em espectrofotômetro (kit Biotécnica®).

No sangue contendo anticoagulante foram determinados o hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), número de eritrócitos, número de células total (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) e diferencial (linfócitos, neutrófilos, monócitos, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS), eosinófilo e basófilo) em extensões sanguíneas submetidas a coloração pelo método de Rosenfeld (1947)

A contagem total dos leucócitos foi realizada por método indireto, através da quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células (Ishikawa et al., 2008). Já o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos.

2.3.8. Capacidade aglutinante do soro

Os títulos de aglutinação foram feitos segundo o método descrito por Yildirim et al. (2003) para a cepa *A. hydrophila* ATCC 7966. A concentração das células inativadas utilizadas no teste foi de 0.8 no comprimento de onda de 550 nm (DO₅₅₀ nm). O teste foi feito em microplaca de 96 poços de fundo U onde o soro foi diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS; 0,2M de Fosfato monobásico, 0,2M de Fosfato dibásico, 0,11M de Cloreto de Sódio, pH 7,4) no 1° poço (50 µL de solução PBS:50 µL do soro), sendo diluído serialmente em fator 2 para os demais poços até o 12°. Nos controles, o

soro foi substituído por solução salina estéril 0,65%. Depois disso, foram adicionados 50 µL da bactéria 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 uma “roseta” no fundo do poço a olho nu. O título aglutinante natural do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.3.9. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada em microplaca de 96 poços (fundo chato) adaptada de Schleder et al. (2008). O soro dos peixes foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana contra a bactéria *A. hydrophila*. Esta bactéria foi cultivada em BHI (Brain Heart Infusion Broth), a 30°C por 24 horas, preparadas na concentração de 0,5 na escala de Macfarland e diluídas em PB (Poor Broth; 1% de peptona, 0,5% NaCl, pH 7,4) 100.000 vezes. O soro filtrado em filtro milipore de 22 µm para eliminação de possível contaminação bacteriana. Cada poço recebeu então 100 µL de PB e 100 µL do soro adicionado apenas ao primeiro poço. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada fator 2 até o 12º poço. Nos controles, o soro foi substituído por solução salina estéril 0,65%. Cada poço recebeu então 15 µL da suspensão bacteriana em crescimento logarítmico (10^2 UFC/mL). A microplaca foi incubada a 25°C por 24 horas sob agitação orbital. O crescimento bacteriano foi determinado em leitora de microplaca (DO_{550nm}). A atividade antimicrobiana do soro foi recíproca da última diluição que apresentou atividade bactericida ou bacteriostática.

3. Análise estatística

Os valores das contagens microbiológicas que apresentaram heterogeneidade de variância pelo teste Barlett e foram transformados para $\log(x+1)$ para homogeneização da variância. Os resultados foram avaliados por análise de variância fatorial 2x3 ($\alpha < 0,05$), sendo o fator 1 alimentado com dieta suplementada com probióticos ou dieta controle; e o fator 2 basal, inoculado com SSE ou com *Aeromonas hydrophila*. Uma vez encontrada diferença entre os tratamentos foi realizado o teste SNK (Student-Newman-Keuls) de separação de médias (Zar, 2009). A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa

computacional Statistica 7.0. Os valores das variáveis deste trabalho são expressos como média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e seleção *in vitro*

Os resultados obtidos nos ensaios de antagonismo, frente à patógenos e crescimento *in vitro*, sugerem que a cepa Q11 (*Leuconostoc lactis*), identificada posteriormente com 78% de probabilidade, possui o maior potencial para ser utilizada como probiótico dentre as cepas isoladas, com média de 10,3mm (Tabela 1). Sendo assim, esta cepa foi selecionada para o ensaio *in vivo*.

Tabela 1: Valores médios dos halos de inibição (mm) de bactérias ácido-láticas contra cepas de bactérias patogênicas.

Cepa	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Micrococcus luteos</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Média
Q11	9	13	0	19	19	0	9	14,7	10,3
Q7	0	8	0	0	0	8	13,7	9	4,3
Q5	0	8	0	0	0	8	14,3	0	4,9
Q2	0	8	3	10,3	0	8	13	0	5,3

4.2. Colonização do trato intestinal de jundiás

Nas contagens do trato intestinal, não foram observados diferenças significativas ($p > 0,05$) para bactérias totais e *Pseudomonas* entre todos os tratamentos (Figura 1).

No trato intestinal de jundiás do grupo controle, foram observadas as menores contagens de bactérias ácido-láticas, entretanto, estes apresentaram número de colônias de *Vibrio* spp. maior ($p < 0,05$) que os alimentados com ração suplementada com as bactérias ácido-láticas.

Os jundiás alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum*, *Leuconostoc Lactis* e Q2 (não identificada) apresentaram maior ($p > 0,05$) contagem de bactérias ácido láticas no trato intestinal.

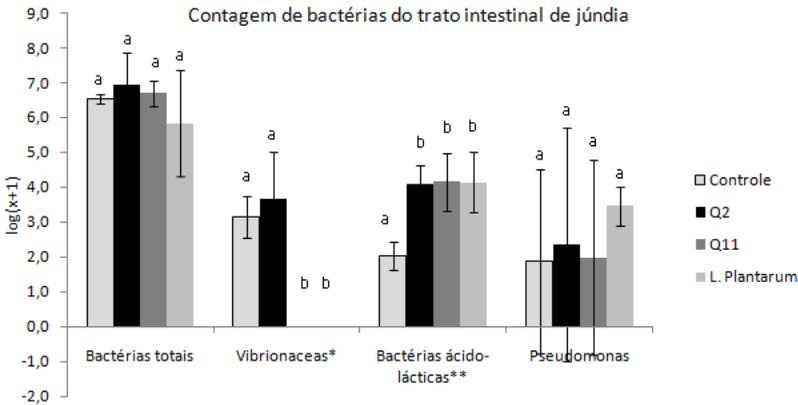


Figura 1: Contagem de bactérias do trato intestinal de jundiá (*Rhamdia quelen*) com ração suplementada com *Lactobacillus plantarum*, Q11 (*Leuconostoc lactis*), Q2 (não identificada) e controle. Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de Tukey.

4.3. Indicadores hematológicos

Nos tratamentos com suplementação de probióticos, durante 25 dias de alimentação experimental, não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre o número total de eritrócitos, a porcentagem de hematócrito, as contagens total e diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e LG-PAS) e a glicose, quando comparados com os tratamentos sem suplementação de probióticos (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros hematológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração comercial (controle) e ração suplementada com *Leuconostoc lactis* (probiótico) após desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os tratamentos consistiram em **NiC**: animais não injetados alimentados com ração comercial. **NiP**: animais não injetados alimentados com ração suplementada com probiótico. **SalC**: animais injetados com 0,1 mL de solução salina estéril a 0,65 % por via intraperitoneal e alimentados com ração comercial. **SalP**: animais injetados com 0,1 mL de salina e alimentados com ração suplementada com probiótico. **AerC**: animais injetados com 0,1 mL de salina contendo 10^7 UFC de *Aeromonas*/mL alimentados com ração comercial. **AerP**: animais injetados com 0,1 mL de salina contendo 10^7 UFC de *Aeromonas*/mL alimentados com probiótico. Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de Tukey.

Parâmetros hematológicos	Tratamento					
	NiC	NiP	SalC	SalP	AerC	AerP
Glicose (mg dL ⁻¹)	28,83 ± 2,91 ^a	30,14 ± 2,91 ^a	28,52 ± 2,81 ^a	28,33 ± 2,42 ^a	29,06 ± 2,91 ^a	30,93 ± 3,37 ^a
Hematócrito (%)	30,71 ± 7,97 ^a	27,78 ± 6,68 ^a	31,76 ± 4,97 ^a	29,72 ± 8,23 ^a	31,7 ± 4,82 ^a	29,88 ± 5,99 ^a
Eritrócito (x 10 ⁶ mL ⁻¹)	1,55 ± 2,48 ^a	1,51 ± 1,61 ^a	1,47 ± 3,23 ^a	1,35 ± 2,81 ^a	1,41 ± 1,58 ^a	1,43 ± 1,97 ^a
Trombócito (x 10 ³ mL ⁻¹)	6,09 ± 1,79 ^a	4,95 ± 0,81 ^a	5,42 ± 1,03 ^a	6,15 ± 2,02 ^a	5,21 ± 0,61 ^a	5,23 ± 0,96 ^a
Leucócito (x 10 ³ mL ⁻¹)	11,96 ± 3,26 ^a	9,45 ± 1,19 ^a	12,71 ± 2,83 ^a	13,21 ± 4,31 ^a	9,97 ± 1,92 ^a	10,87 ± 1,42 ^a
Linfócitos (x 10 ³ mL ⁻¹)	9,13 ± 2,04 ^a	8,87 ± 1,11 ^a	11,26 ± 2,61 ^a	10,4 ± 3,35 ^a	9,02 ± 2,17 ^a	9,09 ± 1,89 ^a
Neutrófilos (x 10 ³ mL ⁻¹)	2,24 ± 1,43 ^a	2,22 ± 0,56 ^a	1,86 ± 0,75 ^a	2,29 ± 1,33 ^a	2,14 ± 1,18 ^a	2,24 ± 1,43 ^a
Monócitos (x 10 ³ mL ⁻¹)	0,53 ± 0,18 ^a	0,47 ± 0,58 ^a	0,36 ± 0,33 ^a	0,37 ± 0,25 ^a	0,31 ± 0,21 ^a	0,39 ± 0,18 ^a
Basófilos (x 10 ³ mL ⁻¹)	0,00 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,01 ^a				
Eosinófilos (x 10 ³ mL ⁻¹)	0,00 ± 0,00 ^a					
LG – Pás (x 10 ³ mL ⁻¹)	0,07 ± 0,05 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,07 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,08 ^a	0,05 ± 0,08 ^a

4.4. Título aglutinante do soro

O título aglutinante do soro dos jundiás contra a bactéria *Aeromonas hydrophila* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com infecção salina ou bacteriana em relação aos peixes do grupo controle.

4.5. Atividade antimicrobiana do soro

O soro dos peixes dos diferentes tratamentos não mostrou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram negativa *Aeromonas hydrophila*.

4.6. Monitoramento dos parâmetros de qualidade de água e biometria

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, amônia total, nitrito e nitrato) entre os tratamentos nos ensaios *in vivo* e *in vitro* não diferiram estatisticamente e permaneceram dentro dos valores recomendados para o bom desempenho da espécie (Baldisserotto, 2004) como apresentado na Tabela 3. Os valores médios do peso e comprimento não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, nos diferentes ensaios, os peixes apresentavam tamanhos distintos.

Tabela 3: Parâmetros de qualidade de água nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Valores apresentados em me dias \pm desvio padrão. As letras representam as diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey.

Parâmetros de qualidade de água	Ensaio		
	Isolamento	Colonização	Infecção
Temperatura (°C)	26,44 \pm 1,12 ^a	28,13 \pm 0,24 ^a	25,08 \pm 0,71 ^a
pH	6,67 \pm 0,29 ^a	6,95 \pm 0,31 ^a	6,34 \pm 0,38 ^a
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	8,27 \pm 0,23 ^a	8,44 \pm 0,41 ^a	8,51 \pm 0,15 ^a
NH ₄ (mg L ⁻¹)	0,24 \pm 0,02 ^a	0,29 \pm 0,09 ^a	0,14 \pm 0,04 ^a
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,24 \pm 0,02 ^a	0,29 \pm 0,09 ^a	0,14 \pm 0,04 ^a
Nitrato (mg L ⁻¹)	0,24 \pm 0,02 ^a	0,29 \pm 0,09 ^a	0,14 \pm 0,04 ^a

5. DISCUSSÃO

Em experimentos, uma prática comumente utilizada é o acompanhamento da qualidade da água dos viveiros, pois a variação em um dos parâmetros físicos e químicos pode interferir nos resultados. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados em todos os experimentos, não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p>0,05$) e, mantiveram-se dentro dos padrões aceitáveis para a espécie (Melo et al., 2002; Baldisserotto, 2004). Em laboratório, os teores de amônia foram mantidos em níveis baixos, devido à renovação constante de água e filtragem biológica. O sifonamento do fundo dos tanques e a renovação constante de água impediram o acúmulo de matéria orgânica, garantindo a manutenção da qualidade da água.

Os valores médios do peso e comprimento inicial e final, bem como a sobrevivência dos jundiás das unidades experimentais não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos nos diferentes experimentos. Entretanto, em relação aos ensaios de colonização e infecção, os animais apresentaram diferenças significativas de peso e comprimento ($p<0,05$), devido principalmente a as diferentes épocas do ano em que estes peixes foram coletados.

Observa-se que os valores relacionados à sobrevivência encontrados neste trabalho após a infecção experimental estão de acordo com os dados apresentados por Meurer et al. (2006) que não verificaram diferença entre o tratamento que recebeu suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* e o tratamento controle. O mesmo resultado foi encontrado por Graeff e Mondardo (2006), que utilizando cinco diferentes percentuais do probiótico (0,02%; 0,04%; 0,06%; 0,08% e 0,10%) além do controle, não verificaram diferença significativa no crescimento dos animais entre os tratamentos. Deve-se ressaltar que, animais mantidos em boas condições de manejo (nutricionais e sanitários), muitas vezes não apresentam respostas de desempenho à inclusão de probióticos na dieta (Meurer et al., 2006). Uma das possíveis explicações é que, nessas condições, a possibilidade de contato dos animais com microrganismos patogênicos é menor, sendo pouco eficientes as ações probióticas. Além disso, os próprios parâmetros ambientais, nutricionais e sanitários mantidas sob controle, adequados ao desenvolvimento dos peixes, faz com que não haja necessidade da ação complementar dos probióticos, uma vez que os animais, teoricamente, já se encontram em condições sanitárias favoráveis, com

sua competência imunológica em equilíbrio com as poucas agressões do meio (Meurer et al., 2006).

Segundo Boijink e Brandão (2001) para juvenis de jundiá as concentrações de 10^8 e 10^9 UFC de *Aeromonas hydrophila* mL⁻¹ são letais após 24 horas. Neste trabalho, as concentrações desta mesma bactéria foram ministradas em 10^7 células/mL não sendo observados sintomas da infecção corroborando com Martins et al. (2008) que infectaram tilápia do Nilo com 10^3 e 10^6 de *Enterococcus* sp. na bexiga natatória. A resposta do sistema imune provocada pela alimentação com probióticos em jundiás neste estudo manteve-se semelhante à encontrada no controle, o que pode estar associado a baixa concentração ministrada das bactérias nos peixes.

Usualmente, testes *in vitro* de antagonismo frente à patógenos, baseados na produção de compostos inibitórios ou na competição por nutrientes, são utilizados para selecionar potenciais bactérias probióticas (Gildberg et al., 1995; Vine et al., 2004; Vásquez et al., 2005).

Neste trabalho, duas das cepas isoladas do trato intestinal de juvenis de jundiá apresentaram inibição do crescimento *in vitro* frente a oito cepas patogênicas corroborando com Jatobá et al. (2008) e Souza et al. (2010). As cepas Q11 (*Leuconostoc lactis*) e Q2 (não identificada) apresentaram maior crescimento em 24h em relação às demais cepas o que pode facilitar a sua produção industrial, justificando a sua escolha para a realização do experimento de colonização dos jundiás.

As bactérias patogênicas oportunistas, particularmente *Aeromonas* spp. fazem parte da microbiota no trato intestinal de peixes de água doce e são agentes causadores de doenças e elevadas mortalidades em cultivos intensivos (Belém-Costa e Cyrino, 2006). Na escolha dos probióticos, a capacidade de adesão, e consequente colonização das bactérias no trato intestinal, e a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de bactérias nocivas no intestino, como a *Aeromonas* spp. são importantes propriedades (Gatesoupe, 2008, Nayak, 2010).

Inúmeros estudos têm demonstrado o interesse na utilização de bactérias ácido-láticas como potenciais probióticos em aquicultura. Nageswara e Babu (2006) e Sahu et al. (2008) relataram a melhoria da flora microbiana intestinal de peixes. A estimulação do sistema imune pela utilização de cepas probióticas foi relatada por Gill et al., (2000); Gullian et al., (2004) e Nayak (2010) para manter o sistema de defesa ativo, aumentando a resistência a vírus, ou controlando populações bacterianas patogênicas que podem afetar a saúde do hospedeiro. Nayak et al., (2007) estudando carpas indianas, *Labeo rohita* alimentadas durante duas semanas com o probiótico *Lactobacillus rhamnosus*

observaram a estimulação na atividade fagocitária. Jatobá et al. (2008), utilizando bactérias ácido lácticas em tilápias observaram alterações na microbiota bacteriana melhorando a resposta inespecífica destes animais contra a infecção experimental com *Enterococcus durans*.

A colonização das bactérias ácido-lácticas no trato intestinal, obtida neste ensaio, foi semelhante em todas as cepas para a contagem de bactérias totais. Em relação às bactérias ácido-lácticas, foram observados valores superiores nos jundiás alimentados com suplementação de probióticos quando comparado ao controle, corroborando com Jatobá et al. (2008).

A colonização por *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc lactis* diminuiu a população de *Vibrio* spp. no trato intestinal destes peixes, indicando que ambas as cepas podem exercer um possível controle antimicrobiano, no estabelecimento de bactérias potencialmente patogênicas no trato intestinal de jundiás. Adicionalmente, sinais clínicos de enfermidade por *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc lactis* em peixes não foram observados durante o fornecimento destas bactérias aos jundiás. Assim, estas cepas podem ser uma alternativa na prevenção de infecções bacterianas e elevadas mortalidades no cultivo de juvenis de jundiá, obtendo peixes saudáveis e com qualidade (Gatesoupe, 2008).

O quadro hematológico em uma situação de estresse é variável e depende da espécie estudada. O hematócrito representa o percentual do volume de sangue correspondente aos glóbulos vermelhos e seu aumento pode estar relacionado a condições estressantes (Brandão et al., 2006). Os níveis de suplementação do probiótico *Leuconostoc lactis* não influenciaram os valores de hematócrito e eritrócitos no presente estudo, corroborando com Jatobá et al. (2008) e Martins et al. (2008) em tilápias infectadas com *Enterococcus durans*. Řehulka (2002), observou aumento na percentagem de hematócrito de peixes infectados por *Aeromonas sobria* e *A. caviae*. Garcia e Moraes (2009) observaram um aumento do número de eritrócitos em *Piaractus mesopotamicus* após a infecção experimental com *A. hydrophila*. Entretanto, alguns estudos mostram que a redução no percentual de hematócrito e número de eritrócitos no sangue podem ser sinais de infecção bacteriana (McNulty et al., 2003; Benli e Yildiz, 2004; Shoemaker et al., 2006).

Os níveis de glicose plasmática têm sido bastante utilizados como bons indicadores de estresse em peixes teleósteos, e suas variações estão relacionadas às respostas secundárias de estresse (Wedemeyer, 1996; Barton, 1997; Martins et al., 2004). Nos peixes estressados as alterações hematológicas, geralmente são acompanhadas de hiperglicemia,

decorrente da liberação aumentada de cortisol, que induz incremento da glicogênese hepática (Tavares-Dias et al., 2001 e Urbinati e Carneiro, 2001). Neste estudo, a glicose não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos após a infecção com *A. hydrophila*. Os níveis de glicose encontrados foram inferiores aos determinados por Barcellos et al. (2003) e Borges et al. (2004) em jundiás não infectados experimentalmente. A não alteração da taxa de glicose e do hematócrito nos peixes alimentados com *Leuconostoc lactis* indica que todos os animais sofreram o mesmo efeito do estresse provocado pelo manejo da injeção.

Neste estudo os parâmetros hematológicos da série vermelha dizem respeito ao estado geral da saúde dos peixes por não apresentarem alterações significativas, indicando que os mesmos encontram-se saudáveis e corroborando com estudos de Ishikawa et al. (2007); Barros et al. (2009) e Harikrishnan et al. (2010).

Os trombócitos são células envolvidas na defesa orgânica nos processos de coagulação e inflamação, além da atividade fagocitária em processos de infecção (Tavares-Dias, 2003; Garcia et al., 2007) frequentes nas extensões sanguíneas do presente estudo. Os valores do número de trombócitos não apresentaram diferenças entre os tratamentos, mostrando que tanto a dose de bactéria inoculada quanto a suplementação com probiótico não influenciaram os resultados. Entretanto, os valores foram semelhantes aos verificados por Tavares-Dias et al. (2002) com variação do número de trombócitos entre 38,540.00-100,800.00 μL^{-1} para jundiás não infectados.

Para a contagem diferencial de leucócitos não foram observadas diferenças significativas em relação aos níveis de suplementação de *Leuconostoc lactis* na dieta do jundiá após o desafio com *A. hydrophila* em relação ao tratamento controle. Os valores de linfócitos, leucócitos e trombócitos foram superiores aos relatados por Garcia e Moraes (2009) em *Piaractus mesopotamicus* infectados com a mesma bactéria. Esses resultados são contrários aos esperados, pois em situação de estresse os peixes apresentam diminuição dos leucócitos totais e linfócitos circulantes em função da liberação de catecolaminas e cortisol que ocasionam a constrição esplênica, aumento do fluxo sanguíneo e migração de alguns leucócitos, com prejuízo nas funções fagocitárias das células (Barton e Iwana, 1991; McDonald e Milligan, 1992; Wendelaar Bonga, 1997), sugerindo que as concentrações e a suplementação com probiótico *Leuconostoc lactis* promoveram boa resposta de leucócitos contra o agente patogênico, como observado também pela não mortalidade após o desafio experimental. Ou ainda, a

infecção pode não ter causado estresse suficiente para a observação de uma possível imunomodulação causada pelo probiótico.

Linfopenia e neutrofilia são comumente observados em peixes expostos a agentes agressores (Secombes, 1996). Entretanto, neste estudo, os valores de neutrófilos apresentaram-se aumentados após o desafio bacteriano nos tratamentos suplementados com dieta controle e probiótica, mas não apresentaram diferenças estatísticas entre os demais tratamentos. Estes resultados corroboram com as observações de Martins et al. (2004) e Garcia et al. (2007), após estresse e desafio experimental com *A. hydrophila*.

Contrariamente, a falta de resposta no número de monócitos circulantes neste estudo, diferiu dos resultados com peixes desafiados com *A. hydrophila*, os quais apresentaram aumento nos valores de monócitos no sangue de *Piaractus mesopotamicus* (Garcia et al., 2007; Garcia e Moraes, 2009) e *Labeo rohita* (Kumar et al., 2008), *Oncorhynchus mykiss* infectadas com *Vibrio anguillarum* (Lamas et al., 1994) e *Oreochromis niloticus* infectadas com *Enterococcus durans* (Jatobá et al., 2008). Estas células possuem atividade fagocitária, além da habilidade de se transformarem em macrófagos e migrarem para o foco inflamatório (Ranzani-Paiva et al., 2003), apresentando um importante papel no sistema imune de peixes (Iwana e Nakanishi, 1996).

Os basófilos e eosinófilos são células de baixa frequência em muitas espécies de peixes, e suas frequências aumentadas podem estar relacionadas a quadros de estresse (Ueda et al., 2001). Neste estudo, houve a presença de basófilos apenas nos peixes alimentados com probióticos e infectados com *A. hydrophila*.

As células PAS positivas ou granulocíticas especiais (LG-PAS) neste estudo apareceram em todos os tratamentos, mas não sofreram influência da suplementação de probiótico na dieta. Sugere-se que estas células podem ter migrado para o sítio inflamado pela aplicação do agente flogógeno, proporcionando o aumento percentual dessas células na circulação (Garcia Leme, 1989).

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é o agente etiológico da septicemia hemorrágica. Nos jundiás inoculados com essa bactéria, após as 24 horas iniciais da inoculação, não foram observados sintomas desta enfermidade. Caso houvesse demanda energética aumentada pelo estresse, na ocasião do desafio, a condição poderia estar refletida nas variáveis hematológicas, mas não foi o que aconteceu confirmando a resistência orgânica e a boa condição de saúde dos peixes. O modo pelo qual o probiótico aumenta a resistência a doenças se dá pelo aumento

dos mecanismos não específicos de defesa, mais do que pelo aumento das respostas imune específicas (Nayak, 2010).

Em relação aos parâmetros imunológicos avaliados, o título aglutinante não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos com e sem suplementação de probióticos em jundiás. O aumento deste índice parece estar relacionado com sinais severos de infecção e associado a uma maior carga bacteriana, devido especialmente a infecções secundárias por bactérias oportunistas.

A atividade antimicobiana do soro constitui também um importante parâmetro do sistema imune dos peixes. Neste estudo, o soro de *R. quelen* não apresentou atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* corroborando com os resultados obtidos por Silva et al. (2009) em *Oreochromis niloticus* após a administração da vacina polivalente contra a mesma bactéria por diferentes vias de aplicação.

As condições de cultivo podem influenciar de forma direta na eficiência da adição de bactérias ácido-láticas (Boratto et al., 2004). Práticas adequadas de manejo, como as utilizadas neste experimento, podem levar a resultados que não mostrem efeito significativo dos probióticos sobre o desempenho dos animais.

Segundo Nayak (2010) os resultados de pesquisas com probióticos, até o momento, são bastante contraditórios quanto à sua eficiência. Essa contradição observada entre os trabalhos justifica-se mediante os dados obtidos em relação à idade do animal, tipo de probiótico utilizado, viabilidade de microrganismos a serem agregados às rações e as condições de armazenamento delas. Mehrim (2009) e Nayak (2010) afirmam que vários aspectos como dosagem inadequada dos microrganismos que compõem os probióticos, falta de desafio sanitário em condições experimentais e uma possível competição com o hospedeiro por nutrientes podem contribuir para a não-expressão de respostas favoráveis ao desempenho quando da utilização de probióticos.

6. CONCLUSÃO

Em aquicultura, a ação probiótica é mais efetiva na prevenção de doenças do que no tratamento. Baseando-se nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que uma cepa de bactéria ácido láctica isolada do trato intestinal de juvenis de jundiás possui a capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *Aeromonas hydrophila*. *Leuconostoc lactis* isolado do trato intestinal de jundiás colonizaram o trato intestinal desta espécie, diminuindo a população de *Vibrio* spp., apresentando potencial para ser utilizado como probiótico no cultivo desta espécie. A suplementação do probiótico potencial *Leuconostoc lactis* na dieta não influenciou as variáveis hemato-imunológicas após o desafio experimental com *Aeromonas hydrophila*, mas certamente aumentou a resposta imune e o estado de saúde do animal, já que promoveu alta resistência dos peixes à doença e nenhuma mortalidade. No entanto, sugere-se que sejam testados maiores concentrações e maiores tempos de exposição destes peixes a infecção aliado com maiores concentrações de bactérias probióticas e períodos de alimentação, diferentes vias de aplicação como inoculação em alimento vivo, assim como coletas periódicas de sangue a fim de se obter melhores resultados sobre a influência deste probiótico na imunocompetência do jundiá e viabilidade em escala comercial.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado (Edital MCT/CNPq n° 27/2007) e Produtividade em Pesquisa a M.L. Martins, a MSc. Roberto Hoppe (Fundação 25 de Julho, Joinville, SC, Brasil), ao Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce – LAPAD pelo auxílio, doação dos animais e fornecimento de ração utilizada no experimento e ao Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Cultivo de Camarões Marinhos – LCM, pelo auxílio nas análises antimicrobiana e aglutinante do soro.

8. REFERÊNCIAS

BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS I.; RUIZ-ZARZUELA I.; CUNNINGHAM D.; VENDRELL D.; MUZQUIZ J.L. Review - The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. *In*: B. Baldisserotto e J. Radünz Neto (org.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: editora UFSM, 2004. p. 67-72.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465-1469, 2003.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; MOTTA, A.C.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; SILVA, L.B. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, São Paulo, v.34, n.3, p.355-363, 2008.

BARJA J.L.; ESTEVES T. 1988. **Patologia Aquícola**. Caicyt, Buenos Aires. 550p.

BARROS, M. M., RANZANI PAIVA, M. J. T., PEZZATO, L. E., FALCON, D. R., GUIMARAES, I. G. Hematological response and growth performance of Nile Tilapia fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 895-903, 2009.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Disease**, v.1, p.3-26, 1991.

BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. *In*: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Society for

Experimental Biology. University of Cambridge, New York, NY. p.1-33. 278pp., 1997.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v.36, n.3, p.281-284, 2006.

BENLI, A. C. K., YILDIZ, H. Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Research**, v. 35, p.1388-1390, 2004.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (TELESOSTEI: PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 503-507, 2001.

BORATTO, A. J.; LOPES, D. C.; OLIVEIRA, R. F. M.; ALBINO, L. F. T.; SÁ, L. M.; OLIVEIRA, G. A. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de Corte Criados em Ambiente de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33(6): p.1477-1485, 2004.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; FREITAS, F. A. Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao (*Ichthyophthirius multifiliis*), **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 29, n. 1, p. 93 – 99, 2007.

BORGES, A.; SCOTTI, L. V.; SIQUEIRA, D.R.; JURINITZ, D.F.; WASSERMANN, G.F. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 30, p. 21-25, 2004.

BRANDÃO, D. A. Profilaxia e doenças. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, R. (org.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 161-189, 2004.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v.36, p.349-356, 2006.

COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Efeito de probiótico na resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.

FAO (Food and Agriculture Organization), **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009, 31p.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase: World Wide Web electronic publication**. 2009. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 24 abr. 2010.

GARCIA LEME, J. **Hormones and inflammation**, CRC Press, Boca Raton, 1989, 238p.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, p. 39-46, 2007.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2008, 100 p.

GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 17-21, 2009.

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.

GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; BAGWALD, J Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with

Aeromonas salmonicida. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 138, p. 23-34, 1995.

GILL, H. S., RUTHERFURD, K. J., PRASAD, J., GOPAL, P. K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). **British Journal of Nutrition**, v. 83, p.167-176, 2000.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.

GRAEFF, A.; MONDARDO, M. Influência do probiótico no crescimento das carpas comum (*Cyprinus carpio* L., 1758) na fase de recria. **Revista Eletrônica de Veterinária – REDVET**, v.7, n.11, 2006. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. Acesso em: 11 jun 2010.

GULLIAN, M., THOMPSON F. AND RODRIGUEZ J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunoestimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 233: 1-14, 2004.

HARIKRISHNAN. R., BALASUNDARAM, C., HEO, M. S. 2010. Supplementation Diet Containing Probiotics, Herbal and Azadirachtin on Hematological and Biochemical Changes In *Cirrhina mrigala* Against *Aphanomyces invadans*. **Fisheries and Aquaculture Journal**, Volume 2010: FAJ-4

HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZZA, A.; NIELSEN, J.; MELCHIOSEN, J.; JENSEN, S.; DUNCAN, H.; AHREN, P.; BIRKBECK, H.; GRAM, L. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.27, p. 360–371, 2004.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.333-42, 2002.

ISHIKAWA, N. M., RANZANI-PAIVA, M. J. T., LOMBARDI, J. V., FERREIRA, C. M. Hematological Parameters in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to sub-lethal concentrations of mercury. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p.619-626, 2007.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T., LOMBARDI, J.V. Metodologia para a quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.54-63, 2008.

IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**, Academic Press, San Diego, p. 207–243. 1996.

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

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, p. 1–14, 2008.

KIRKAN, S.; GOSKSO,Y. E.O.; KAYA, O.. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchers farms. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50 B, p. 339-342, 2003.

KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; O DONOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.547-555, 2002.

KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 15 n. 89, 2005

KUBITZA, F.; ONO, E.A.; CAMPOS, J.L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: Uma análise da produção e obstáculos na piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, julho/agosto, 2007.

KUMAR, R.; MUKHERJEE S.C.; RANJAN, R. & NAYAK, S.K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*; **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p.168-172, 2008.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADON, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **Journal of Fish Biology**, v. 45, n. 5, p. 839-854, 1994.

MARTINS M.L.; PILARSKY F.; ONAKA E.M.; NOMURA D.T.; FENERICK J.; RIBEIRO K.; MYIAZAKI D.M.Y.; CASTRO M.P.; MALHEIROS E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, p.71-80, 2004.

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE NETO, C.C.; PEREIRA JR., G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p.631-637, 2008.

MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. New York: Cambridge University Press, 1997. p. 119-144.

MCNULTY S.T.; KLESIOUS P.H.; SHOEMAKER C.A.E; EVANS J.J. Hematological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, p. 418-422, 2003.

MEHRIM, A.I. Effect of dietary supplementation of Biogen (Commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. **Journal of Fishery Aquatic Science**, v.4, n.6, p.261-273, 2009.

MELO, J.F.B.; RADÜNZ NETO, J.; SILVA, J.H.S.; TROMBETTA, C.G. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. **Ciência Rural**, v.32, p.323-327, 2002.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 157- 168, 1995.

MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M. M., MAUERWERK, V. L., FRECCIA, A. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias do Nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1881-1886, 2006.

NAGESWARA, P. V., BABU D. E. Probiotics as an alternative therapy to minimize or avoid antibiotics use in aquaculture. **Fishing Chimes**, v. 26 (1), p.112-114, 2006.

NAYAK, S.K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.892-896, 2007.

NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n.1, p.2-14, 2010.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2ª ed., Maringá, Eduem, 2002. p. 104-105.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G.A.; PANCHENIAK, E.M.G.; SOCCOL, E.F.R.C. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v.264, p.70-78, 2006.

RANZANI-PAIVA, M. J. T; RODRIGUES, E. L; VEIGA, M. L; EIRAS. A. C; CAMPOS, B.E.S. Differential Leukocytes Counts in "DOURADO" *Salminus maxillosus* ALENCIENNES, 1840, From the

Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP, **Brazilian Journal of Biology**, v.63, n.3, p. 517-525, 2003.

ŘEHULKA, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. **Acta Veterinaria Brno**, v.71, p.351-360, 2002.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.329-334, 1947.

SAHU, M. K., SWARNAKUMAR, N. S., SIVAKUMAR, K., THANGARADJOU, T., KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48: p. 299-308, 2008.

SCHLEDER D.D.; KAYSER M.; SÜHNEL S.; FERREIRA J.F.; RUPP G.S.; BARRACO M.A. Modulation of some hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 256-263, 2008.

SECOMBES, C. J. **The fish immune system: the nonspecific immune system – cellular defenses**. London: Academic Press, 1996.

SHOEMAKER C.A.; LIM C.; YILDIRIM-AKSOY M.; WELKER T.L.; KLESIUS P. Growth response and acquired resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) that survived *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 1238-1245, 2006.

SILVA, B. C.; MARTINS, M. L.; JATOBÁ, A.; BUGLIONE NETO, C.C.; VIEIRA, F.N., PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q.; MOURIÑO, J. L. Resposta hematológica e imunológica de tilápia do Nilo após administração de vacina polivalente por diferentes vias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 874-880, 2009.

SOUZA, R.M.; MOURIÑO, J.L.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-

peva (*Centropomus parallelus*, Poey, 1860). **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, São Paulo, v. 36(1), p. 17-24, 2010.

TAVARES-DIAS, M. Physiology responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, São Paulo, v. 27(1), p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32 (4), p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003, 209p.

TINH, N.T.N; DIERCKENS, K., SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. **Marine Biotechnology**, v.10, p. 1-12, 2008.

UEDA, I.K; EGAMI, M. I; SASSO, W. S; MATUSHIMA, E.R. Citochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus,1758) (Cichlidae, Teleostei) – Part II. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, V.38,n.6, p.273-277, 2001.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrixã, *Bricon cephalus* (Teleost: Characidae) to transport stress under influence benzocaine. **Journal Aquaculture Tropical**, v. 16 (1), p. 75 – 85, 2001.

VASEEHARAN, B; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. por *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36: p. 83-87, 2003.

VAZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, Amsterdam, 245: 149– 161, 2005.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. 2004 Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, Stirling, v. 27, p.319-326, 2004.

VERSchURE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELoOS, P.; VERSTRACt, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

WENDELAAR BONGA. S. A. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591 – 625, 1997.

WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Chapman and Hall, New York, 1996, 232 p.

WHO -World Health Organization. Microbial fact sheets. In: World Health Organization. **Guidelines for drinking–water quality**. 3. ed. Geneva, 2004. v. 1

YLDIRIM M., LIM, C., WAN, P.; KLESIOUS, P.H. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid. **Aquaculture**, v. 219, p. 751-768, 2003.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de Água Doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura: experiências brasileiras**. 1 ed. Santa Catarina, Ed.Multitarefa, 2004, cap. XIV, p.337-368.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 2009. 576p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piscicultura é uma atividade que tem crescido muito nos últimos anos no país, pois o Brasil possui um grande potencial em consequência do seu vasto território e de suas condições climáticas que favorecem a implementação do cultivo de peixes de água doce.

O cultivo de peixes pode ser feito utilizando-se diversos sistemas: extensivo, semi-intensivo, intensivo e super-intensivo. Sendo que nos cultivos intensivos e super-intensivos há um grande aumento de produtividade, quando comparadas com as populações naturais, e isso implica em densidades populacionais muito elevadas e numa sobrecarga de alimentação artificial, modificando o ecossistema.

Esse desequilíbrio do ambiente favorece o surgimento de doenças, devido à presença de diferentes agentes patogênicos. Além disso, em regime de confinamento, os peixes ficam submetidos ao estresse crônico resultante do manejo inerente ao cultivo e da degradação do ambiente. Esses fatores têm aumentado a ocorrência das enfermidades e, conseqüentemente, da mortalidade levando às grandes perdas econômicas no setor.

Em razão das grandes perdas econômicas causadas pelas enfermidades bacterianas há a necessidade do desenvolvimento de produtos que aumentem a resistência dos peixes e que estimulem o seu crescimento.

Os probióticos são reconhecidos por seu potencial para melhorar a função imune e aumentar a resistência a doenças, sendo uma alternativa ao uso de antibióticos na aqüicultura. As pesquisas com probióticos ainda são recentes na aqüicultura mundial. No Brasil, as áreas de aplicação têm se expandido e o uso desses produtos na dieta das espécies nativas vem sendo avaliado. Contudo, algumas questões ainda necessitam ser elucidadas para a obtenção de melhores respostas, visto que as informações disponíveis são muitas vezes contraditórias.

Estudos que contribuam para reforçar o entendimento do mecanismo de ação do sistema imune do jundiá em condições adversas encontradas em sistemas de criação intensiva, quando da utilização da suplementação de probióticos em sua dieta, são necessários, principalmente em função das divergências de resultados obtidos com as espécies nativas, havendo a necessidade de padronização dos protocolos de administração, da quantidade de suplemento incorporada à dieta e da duração da administração para a promoção da proteção dos peixes para o desenvolvimento da atividade, especialmente em cultivos intensivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ABREU, J.S. Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. **Tese** (Doutorado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. Review. **Journal of Fish Diseases**, v.26, p.499-509, 2003.

AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L. TAN., B., ZHANG, W.; XU, W., LI, H. Effects of dietary 1,3 β -glucan on innate immune response of large yellow croaker *Pseudosciana crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394 – 402, 2007.

ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.126, p.171-198, 2008.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.; GHAREEB, A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections, **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p.128-136, 2008.

ANGKA S.L.; LAM T.J.; SIN Y.M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v.130, p. 103–112, 1995.

AOKI, T.; TAKANO, T.; SANTOS, M.D.; KONDO, H.; HIRONO, I. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. In: K. TSUKAMOTO, T. KAWAMURA, T. TAKEUCHI, T. D. BEARD, JR. AND M. J. KAISER, eds. **Fisheries for Global Welfare and Environment**, 5th World Fisheries Congress, pp. 263–276, 2008.

ARAUJO, C.S.O. ; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A.L.S. ; ANDRADE, S.M.S. ; LEMOS, J.R.G.; OLIVEIRA, A.T. ; CRUZ, V.R ; AFFONSO, E.G. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: Tavares-Dias, M.(Org.). **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. 1 ed. Macapá, AP: Embrapa Amapá, v. 1, p. 389-424, 2009.

ARAKI, K.; ARATSU, K.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Characterization of CD8+ leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8a. **Developmental and Comparative Immunology**, v.32, p.850-858, 2008.

BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS I.; RUIZ-ZARZUELA I; CUNNINGHAM D.; VENDRELL D.; MUZQUIZ J.L. Review - The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; DEBLAS, I.; RUIZZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J.; GIRONES, O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v.278, n.1-4; p. 188-191, 2008.

BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. In: B. Baldisserotto e J. Radünz Neto (org.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 67-72, 2004.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora UFMG. Santa Maria, 2005, p.460.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.291-299, 2009.

BARCELLOS, L.J.G., WOEHL, V.M., WASSERMANN, G.F., QUEVEDO, R.M., ITTZÉS, I., KRIEGER, M.H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v.32, p.121-123, 2001.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, p. 229-236, 2004.

BARTON, B. A.; IWANA, G. K.; Physiological changes in fish from estresse in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases (Journal Seek)**. v. 1, p. 3-26, 1991.

BELÉM-COSTA A.; CYRINO J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sciencia Agricola* 63(3):281-284, 2006.

BILLER, J.D. **Respostas fisiopatológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β -glucano**. Dissertação (Mestrado) - Zootecnia, Universidade estadual paulista Jaboticabal, 2008.

BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, D.A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 503-507, 2001.

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPERRECK, M.A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

BRANDÃO, D.A. Profilaxia e doenças. In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. (Eds.). **Criação de Jundiá**. Editora UFSM, Santa Maria, p. 161-189, 2004.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CRESCÊNCIO, R.; CARVALHO, E.S. Uso de sal durante o transporte de juvenis (1kg) de pirarucu (*Arapaima gigas*). **Acta Amazônica**, v.38, p.767-771, 2008.

BURR G, GATLIN III D, RICKE S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. **Journal World Aquaculture Society**, v. 36(4), p.425-436, 2007.

CAI, W.; LI, S.; MA, J.. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. **Aquaculture**, v. 229, p. 79-87, 2004.

CARNEIRO, P.C.F.; KAISELER, P.H.S.; SWAROFSKY, E. de A.C.; BALDISSEROTTO, B. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, v.7(2), p. 283-288, 2009.

CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; BORDINHON, A.M.; FONSECA, F. A. L.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. A. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v.39, n.5, p. 513-516, 2004.

CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T.E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009, p.132-225.

CHAGAS, E.C. **β -glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossoma macropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonas hydrophila*: desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas**. Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2010, 141 p.

CHANG, C.I.; LIU, W.Y. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L., **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.311-315, 2002.

CHOI, S.H.; YOON, T.J. Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary heat-inactivated potential probiotics. **Immune Network**, v.8(3), p.67-74, 2008.

CLAIRE, M.; HOLLAND, H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399-420, 2002.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. *In*: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (org.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: ed. UFSM, pp. 23-36, 2005.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotics strains for human applications **International Dairy Journal Amsterdam**, Amsterdam, v. 8, p.487-490, 1998.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2333-2342, 2008.

DAS, S.; WARD, L.R.; BURKE, C. Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.81, p. 419-429, 2008.

DE PEDRO, N.; GUIJARRO, A. I.; LÓPEZ-PATIÑO, M.A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; DELGADO, M. J. Daily and seasonal variations in haematological and biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. **Aquaculture Research**, v.36, p. 1185-1196, 2005.

DIAZ-ROSALES, P.; ARIJO, S.; CHABRILLON, M.; ALARCON, F.J.; TAPIA-PANIAGUA, S.T.; MARTINEZ-MANZANARES, E.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Aquaculture**; v. 293, p.16-21, 2009.

DOTTA, G.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; JATOBÁ, A.; MORÁN, R.E.B.; MARTINS, M.L. Acute inflammatory response in

Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 2011. *In press*.

DUCCINI-SANTOS, C. P.; SANTOS-PERESTRELO, C.; AQUINO-SILVA, M. R.; GIRARDI, L.; FIORINI, M. P. Estudo hematológico de Tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanque-rede. IN: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e IV ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2004, **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

DÜGENCI, S.K., ARDA, N.; Candan, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, 88(1): 99-106, 2003.

EPAGRI/CEPA, 2009. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2009. Desempenho da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: <http://www.cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese_2009/aquicultur_a_sintese_2009.pdf> Acesso em 23.mar.2010.

FAGUNDES, M. Estudos fisiológicos e metabólicos do estresse de manejo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2009, 139 p.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v.276, p.112-119, 2008.

FALCON, D.R. **β -glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração**. Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2007, 158 p.

FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O.; SAMPAIO, A.H. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Revista Ciência Agronômica**, 35(número especial):189-195, 2004.

FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AcuaTic**, v.16, 2002.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

FIGUEIREDO, H.C.P.; CASTRO, G.A.C.; LEAL, C.A.G.; NETTO, L.N. Uso de vacinas na piscicultura: verdades, mitos e perspectivas. **Panorama da Aqüicultura**, 19(115): 22-31, 2009.

FRACALOSI, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desempenho do Jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

FRACALOSI, D.M.; BORBA, M.R.; OLIVEIRA FILHO, P.R. C.; MONTES-GIRAO, P.J.; CANTON, R. O mito da onivoria do jundiá. **Panorama da Aqüicultura**, v. 100, n. 1, p. 36-40, 2007.

FRITZ, J.H.; LE BOURHIS, L., MAGALHÃES, J.G.; PHILPOTT, D.T. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. **Trends in Immunology**, v.29, p.41-49, 2007.

FULLER, R. **Probiotics**. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, 1992.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoglicosacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2008, 100 p.

GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 17-21, 2009.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotic 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.

GILL, H.S.; RUTHERFURD, K.J. Probiotic supplementation to enhance human natural immunity: effects of a newly characterized immunostimulatory strain (*Lactobacillus rhamnosus* HN001) on leukocyte phagocytosis. **Nutrition Research**, v. 21, p. 183-189, 2001.

GODOY, D.T.; MIAN, G.F.; ZANOLO, R.; YUHARA, T.Y.; FARIA, F.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. **Aquaculture**, v. 285, p. 255-259, 2008.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) - Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; URBINATI, E.C. Effect of fish density on the stress physiological responses and mortality of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) during transportation. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.34, p.76-84, 2003.

GOMES, L.C.; BALDISSEROTTO, B.; CHAGAS, E.C.; ROUBACH, R.; BRINN, R.P.; COPPATI, C.E. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006.

GÓMEZ, R. G. D.; BALCÁZAR, J. L.; SHEN, M. A. Probiotics as control agents in aquaculture. **Journal of Ocean University of China**, China, v.6, n.1, p.76-79, 2007.

HARIKRISHNAN, R.; NISHA RANI, M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v.221, p.41-50, 2003.

HERNÁNDEZ, A.; TORT, L. Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15 p. 479-481, 2003.

HIRSCH, D.; JÚNIOR, D.J.P.; LOGATO, P.V.R.; PICCOLI, R.H.; FIGUEIREDO, H.C.P.; Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n. 6, p. 1211-1217, nov./dez., 2006.

HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, 399-420, 2002.

HRUBEC, T. C., SMITH, S. A. Hematology of fish. In: Feldman, B.V., Zinkl, J.G., Jain N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1120- 1125, 2000.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2007. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação**. 147p, 2009. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/download/25/.pdf>>. Acesso em 19.fev.2010.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.333-42, 2002.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T., LOMBARDI, J.V. Metodologia para a quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.54-63, 2008.

IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**, Academic Press, San Diego, p. 207–243. 1996.

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

KAATTARI, S.L.; PIGANELLI, J.D. The specific immune system: humoral defense. *In*: G. Iwama and T. Nakanishi, Editors, **The Fish Immune System**, Academic Press, San Diego, pp. 207–243. 1996.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, p. 1–14, 2008.

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, 2006.

KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; O'DONOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 547–555, 2002.

KOLMAN, H.; TERECH-MAJWWASKA, E.; KOLMAN, R.; SZAREK, J.; SWIATECKI, A. The ingestion of *Aeromonas salmonicida* by fish blood phagocytes in vitro under influence of herbicides. **Acta Piscaria**, v.2, p.123-130, 2003.

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases**, v. 30, p. 293-301, 2007.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3ª ed. Jundiaí: F. Kubitza. 95 p., 1999.

KUBITZA, F.; ONO, E.A.; CAMPOS, J.L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: Uma análise da produção e obstáculos na piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, julho/agosto, 2007.

KUMAR, R.; MUKHERJEE, S. C.; PRASAD, K. P. e PAL, A. K. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). **Aquaculture Research**, v.37, p. 1215 – 1221, 2006.

KUMAR, R.; MUKHERJEE S.C.; RANJAN, R. & NAYAK, S.K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following

oral administration of *Bacillus subtilis*; **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p.168-172, 2008.

LAZZARI, R.; NETO, J.R.; EMANUELLI, T.; PEDRON, F.DE A.; COSTA, M.L.; LOSEKANN, M.E.; CORREIA, V.; BOCHI, V.C. Diferentes fontes protéicas na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.36, p. 240-246, 2006.

LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Tilapia: biology, culture and nutrition**. Haworth Press, New York, USA. 2006, 678 p.

LIN, M.F.; SHIAU, S-Y. Dietary-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune response and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 244, p.215-221, 2005.

LIN, Y.H.; WANG, H.; SHIAU, S.Y. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v.15, p.117-122, 2009.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish. An overview. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p.137-151, 2006.

MAIER, V.H.; SCHMITT, C.N.Z.; GUDMUNSDOTTIR, S.; GUDMUNSSON, G.H. Bacterial DNA indicated as an important inducer of fish cathelicidins. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2352–2358, 2008.

MAITA, M. Fish health assessment. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D.M. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. UK: Cromwell Press, p.10-34, 2007.

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE NETO, C.C.; PEREIRA JR., G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p.631-637, 2008.

MCGUINNESS, D.H.; DEHAL, P.K.; PLEASS, R.J. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. **Trends in Parasitology**, v.15, p.312-319, 2003.

MEDZHITOV, J.R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v.449, p.819-826,2007.

MEHRIM, A.I. Effect of dietary supplementation of Biogen (Commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. **Journal of Fishery Aquatic Science**, v.4(6), p.261-273, 2009.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 157- 168, 1995.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; MAUERWERK, V.L.; FRECCIA, A. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-Nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35 (5), p.1881-1886, 2006.

NAYAK, S.K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.892-896, 2007.

NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n.1, p.2-14, 2010.

NEWAJ-FYZUL, A.; ADESIYUN, A.A.; MUTANI, A.; RAMSUBHAG, A.; BRUNT, J.; AUSTIN, B. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1699-1706, 2006.

NIKOSKELANEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. et al. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2430-2435, 2001.

OLIVEIRA, S.R. **Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos

Naturais), Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, AM. 2008, 101 p.

PALAKSHA, K.J.; SHIN, G.W.; KIM, Y.R.; JUNG, T.S. Evaluation of nonspecific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p.479-488, 2008.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.243, p. 241-254, 2005.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Artmed, Porto Alegre, 2001, 372 pp.

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

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2ª ed., Maringá, Eduem, 2002. p. 104-105.

PEDDIE, S.; ZOU, J.; SECOMBES, C.J. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of ergosan. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.86, p.101-113, 2002.

PEREIRA, L.G.C. Pesca e aquicultura no Brasil. **Consultor Legislativo da Área X Agricultura e Pesca**, p.1-15, 2007.

PICCHIETTI, S; MAZZINI, M.; TADDEI, A.R.; RENNA, R.; FAUSTO, A.M.; MULERO, V.; CARNEVALI, O.; CRESCI, A.; ABELLI, L. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. **Fish Shellfish & Immunology**, v.22, p.57-67, 2007.

PLUMB J.A. Infectious diseases of tilapia. In: **Tilapia aquaculture in the Americas**, vol. I. Costa-Pierce, B.A.; Rakocy, J.E. eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Luisiana, USA, 1997, p. 212-228.

PORTZ, L. Recentes Avanços na Imuno-Nutrição de Peixes. In: SILVA-SOUZA, A.T. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá: ABRAPOA. 2006, p.229-236.

RALL, V.L.M.; IARIA, S.T.; HEIDTMANN, S.; PIMENTA, S.C.; GAMBA, R.C.; PEDROSO, D.M.M. *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatystoma* sp): Virulence factors and drug susceptibility. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.222-227, 1998.

RAMIREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. 2005. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005, 180 p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. Hematologia de peixes Brasileiros In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Varela, São Paulo, 2004, p. 89-120.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, **Anais...** 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes. Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista, 2007, 74p.

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

RODRIGUES, J.A.G.; ALENCAR, D.B.; PIRES, K.M.S.; SABOYA, J.P.S.; ARAÚJO, G.S.; TORRES, V.M.; FARIAS, W.R.L. Efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* em alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidos à diferentes salinidades. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, 4(2): 20-33, 2009.

RODRIGUES, J.A.G.; BENEVIDES, N.M.B. Extração de mucopolissacarídeos da pele de carpa- comum: ferramenta auxiliar de

parâmetro imunológico?. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca** 5(1): 19-23, 2010.

ROITT, I.M.; MALE, D.K.; BROSTOFF, J. **Imunologia**. Manole, São Paulo, 2003, 481 pp.

RUS H, CUDRICI C, NICULESCU F. The role of the complement system in innate immunity. **Immunology Research**; v.33, p.103-12, 2005.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MALTTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197–215, 2000.

SAHU, M.K.; SWARNAKUMAR, N.S.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, p.1-10, 2008.

SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. Immunoestimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Disease**, v.24, p.433-438, 2001.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39. p. 223-239, 2008.

SCHÜTT, D.A.; LEHMAN, J.; GOERLICH, R.; HAMMERS, R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I. blood parameters and light microscopy of blood cells. **Journal of Applied Ichthyology**, v.13, p.83-89, 1997.

SECOMBES, C. J. **The fish immune system: the nonspecific immune system – cellular defenses**. London: Academic Press, 1996.

SELVARAJ V.; SAMPATH K.; SEKAR V. Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune

parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology. Immunopathology**, v. 114, p.15–24, 2006.

SHAMA, S.; BRANDÃO, D. A.; de VARGAS, A. C.; da COSTA, M. M.; PEDROZO, A. F. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de Jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.293-298, 2000.

SHARIFUZZAMAN, S.M.; AUSTIN, B. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. **Fish Shellfish & Immunology**, v.27, p.440-405, 2009.

SHOEMAKER C.A.; KLESIUS P.H. Streptococcal disease problems and control: a review. In: FITZSIMMONS, K. (Ed.) **Tilápia Aquaculture**, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, v. 2, p. 671–680, 1997.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press, 2001. p.149-162.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 1126-31, 2007.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Department of zoology, Stockholm University and Departement of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History – Stockholm, 156 p., 1996.

SILVA, L.B.; BARCELLOS, L.J.G.; QUEVEDO R.M.; SOUZA, S.M.G.; KESSLER, A.M.; KREUTZ, L.C.; RITTER, F.; FINCO, J.A.; BEDIN, A.C. Introduction of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) increases the productivity of carp polyculture in southern Brazil. **Aquaculture Research**, v. 39 n. 5, p. 542 – 551, 2008.

SILVA, B. C.; MARTINS, M. L.; JATOBÁ, A.; BUGLIONE NETO, C.C.; VIEIRA, F.N., PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q.; MOURIÑO, J. L. Resposta hematológica e imunológica de tilápia

do Nilo após administração de vacina polivalente por diferentes vias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 874-880, 2009.

SIWICKI, A.K.; ZAKES, Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KOWALSKA, A.; MALACZEWSKA, J. Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. **Aquaculture Research**, v.40, p.405-411, 2009.

SONG, Z.; WU, T.; CAI, L.; ZHANG, L.; ZHENG, X. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuyi*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.7(7), p.596-602, 2006.

TAKAHASHI, L.S.; ABREU, J.S.; BILLER, J.D.; URBINATI, E.C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.28, p.469-475, 2006.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J.Y.; KIM, S.M.; PARK, S.; YOSHIKAWA, T.; SAKATA, T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisher Scientific**, v.72, p.755-766, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, v.1, 2004, 144 p.

TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v.68, p.1822-1833, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B.; JERÔNIMO, G.T.; SANT'ANA, A.R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN-NETO, M.; POZZOBON-SORIA, W.S. (Eds.). **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, p.43-72.

TINH, N.T.N.; DIERCKENS, K.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. **Marine Biotechnology**, v.10, p. 1-12, 2008.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Roca, 2002, 532 p.

TORT, L., BALASCH, J. C., MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Revista Imunología**, 22(3): 277-286, 2003.

TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture International**. v.9, p.413-419, 2001.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. Loading and transport estresse in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**. v. 229, p. 389-400. 2004.

VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish & Shellfish Immunology**. v.13, p.183-198, 2002.

VANDENBERG G.W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? **Animal Health Research Reviews**, v. 5, p. 301–304, 2004.

VÁZQUEZ , J.A.; GONZÁLEZ , M.P.; MURADO , M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v.245, p.149-161, 2005.

VERSCHURE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRACT, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

VILCHES, S.; URGELL, C.; MERINO, S.; CHACÓN, M. R.; SOLER, L.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; TOMÁS, J. M. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. **Applied Environmental Microbiology**, 70, 6914-9, 2004.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. Competition for attachment probiotics and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 6, p. 319-326, 2004.

VINE, N. G.; LEUKES, W.D.; HORST, K Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 30, p.404-427, 2006.

VITULE, J.R.S.; FREIRE, C.A; SIMBERLOFF, D. Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. **Fish and Fisheries**, v. 10, p. 98-108, 2009.

WANG, Y.B.; LI, J.R.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. **Aquaculture**, v.281, p.1-4, 2008.

WEDEMEYER, G. A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. New York: Chapman & Hall, 1996. 78 p.

WHO -World Health Organization. Microbial fact sheets. In: World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 3. ed. Geneva, 2004. v. 1

WHYTE, S.K. The innate immune response in finfish: a review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**. v.23, p.1127-1151, 2007.

YOSHINAGA T.; SEGAWA, I.; YAMANO, K.; IKEDA, H.; SORIMACHI, M. Anemia caused by challenges with the monogenean *Neoheterobothrium hirane* in the Japanese flounder. **Fish Pathology**, v. 31, n. 1, p. 19-23, 1996.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de Água Doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura: experiências brasileiras**. 1 ed. Santa Catarina, Ed.Multitarefa, 2004, cap. XIV, p.337-368.

ZAPATA, A.; ANEMIYA, C.T. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. Origin and evolution of the vertebrate immune system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.248, p.67-107, 2000.

ZAPATA, A.; DIEZ, B.; CEJALVO, T.; GUTIERREZ-DE FRIAS, C.; CORTES, A. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish & Shellfish Immunology**. v.20, p.126-136, 2006.

ANEXO



Figura 2: Atividades realizadas na Fundação 25 de Julho: A: Captura dos peixes; B: Colocação dos tanques-redes; C: Unidades experimentais; D: Arraçoamento dos peixes.



Figura 3: Atividades realizadas no Laboratório AQUOS: A: Unidades experimentais; B: Biometria; C: Coleta de sangue; D: Contagem de células sanguíneas.