

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PROBIÓTICO NA DIETA DE SURUBINS
Pseudoplatystoma spp.

Acadêmico: André Luiz Nunes

Aquidauana-MS
Fevereiro/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PROBIÓTICO NA DIETA DE SURUBINS
Pseudoplatystoma spp.

Acadêmico: André Luiz Nunes
Orientadora: Dra. Cristiane Fátima Meldau de Campos Amaral

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”

Aquidauana-MS
Fevereiro/2013

N923p Nunes, André Luiz

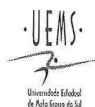
Probiótico na dieta de surubins *Pseudoplatystoma spp.*/André
Luiz Nunes. Aquidauana, MS: UEMS, 2013.
99p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Zootecnia –
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2013.

Orientadora: Prof. Dr^a Cristiane Fátima Meldau de Campos
Amaral

1. Aquicultura 2. Probiótico 3. Surubim I. Título.

CDD 20.ed. 639.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
PRODUÇÃO ANIMAL NO CERRADO-PANTANAL



ANDRÉ LUIZ NUNES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/02/2013.

Dra. Cristina Fátima Meldau de Campos Amaral (UEMS),
Orientadora.

Dra. Fabiana Garcia (APTA).

Dra. Fabiana Pilarski (UNESP).

Dra. Elis Regina de Moraes Garcia (UEMS).

*Com muito amor e orgulho dedico:
a Deus e aos meus pais,
que sempre estiveram ao meu lado.
Em especial aos meus irmãos e minha cunhada
Giva, Maninha e Cris.
E a minha mãe científica
Cristiane Meldau.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe e meu pai, que nunca mediram esforços para a conquista desse título, foram amigos, colaboradores, banco e sempre trouxeram a paz nos momentos que precisei.

À pessoa precursora desta pesquisa, que é amiga, conselheira e mãe científica, a Dra. Cristiane Meldau, agradeço eternamente pela paciência, amizade, alegrias, churrascos e ensinamento. Agradeço muito ao período de seis anos de trabalhos. Devo muito à senhora.

Ao meu eterno amigo e irmão Negão (Martinho) pela grande amizade, sem mais palavras a ele. Grande companheiro de luta.

Ao grande profissional e grande amigo Robson pela compreensão, apoio, preocupação, ensinamentos e a grande ajuda no decorrer da pós, sempre serei grato a você.

A minha namorada Deise, pela atenção, carinho, paixão, amor, apoio, compreensão e animação para escrever a dissertação.

As *best friends* Rosileide e Karla, por momentos incríveis de alegria e felicidade neste período, pessoas maravilhosas. Ao Marcos, pela enorme paciência, amizade e alegria durante este período, foi uma das pessoas que sempre me incentivou a continuar esta caminhada.

Agradeço a Milena e Aline Mayra pela amizade, vários momentos de alegria e pela ajuda durante o mestrado. Agradeço a Letícia pela amizade, ajuda, companheira de vários trabalhos. Aos irmãos científicos, amigos, companheiros, conselheiros e incentivadores, Nandara, Pamela Thainara, Pamela Thomaz e ao mais novo “cacharinha” do grupo, Anderson, sem vocês com certeza a finalização deste trabalho não teria ocorrido.

Aos professores das disciplinas cursadas durante a pós-graduação e que muito contribuíram para o enriquecimento da minha formação acadêmica e profissional.

A Dra. Danielle Dias (Instituto de Pesca), Dra. Raquel Marçal (UEM) e ao Dr. Mouriño (UFSC) pela IMENSA ajuda, disponibilização dos laboratórios, tempo, e pela competência nas opiniões das análises. A Gabriella Pereira do

LCM da UFSC, pelo esforço e colaboração nos testes realizado, muito obrigado.

Ao pessoal do Laboratório de Ictioparasitologia e de Química (UEMS), de Histologia (UEM), Laboratório de Microbiologia (UFSC) e do APTA Pirassununga pelo esforço concedido e ajuda nas análises. Ao professor Carlos Eurico, do laboratório de patologia veterinária (UFMS), e a Kethleen pela ajuda no processamento histológico.

À banca examinadora da qualificação e defesa Dra. Elis Regina, Dra. Liliam Hayd, Dra. Fabiana Pilarski, Dra. Fabiana Garcia e Dra. Marcia Ishikawa pelas correções, idéias e soluções que enriqueceram este trabalho.

A Mariuciy Gomes, milhares de dúvidas e problemas resolvidos na secretaria.

Ao senhor Yassuo Kassai, Rodrigo Kassai e a Piscicultura Pírai pela doação dos animais nos experimentos, sem esta empresa a dificuldade seria imensa para a realização de vários trabalhos, um agradecimento enorme, obrigado mesmo.

À UNIQUIMICA Ltda, em nome de Carina Nishio e Katia Nagano pela doação do probiótico e análise microbiológica da ração.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

E sempre ao cara lá de cima, Deus, o renovador da alma, que deu energia e força inexplicável, a “pessoa” mais solicitada neste período e por permitir encontrar neste caminho tantas pessoas maravilhosas, cuja ajuda facilitou a conclusão deste trabalho. E um muito obrigado aos amigos não citados, peço perdão, pois são muitos, e a todos que participaram desta caminhada e história.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
1 – Introdução.....	01
2 – Revisão de literatura.....	03
2.1 <i>Pseudoplatystoma</i> spp.	03
2.2 Probiótico	05
2.3 Probiótico <i>Bacillus</i>	08
2.4 Sistema imune e fagócitos	09
3 – Objetivos.....	12
4 – Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO 2 - TEMPO DE MIGRAÇÃO DE MÁCROFAGOS DO SURUBIM <i>Pseudoplatystoma</i> spp. FRENTE A INOCULAÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisae</i>	20
Resumo	21
Abstract	22
Introdução.....	23
Material e Métodos	25
Resultados e Discussão	27
Conclusão.....	31
Agradecimentos.....	31
Referências	31
CAPÍTULO 3 - BACTÉRIAS PROBIÓTICAS PARA O SURUBIM <i>Pseudoplatystoma</i> spp.: INIBIÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS.....	36
Resumo	37
Abstract	38
Introdução.....	39
Material e Métodos	41

Resultados e Discussão	42
Conclusões	46
Agradecimentos.....	46
Referências	47
CAPÍTULO 4 - DESEMPENHO PRODUTIVO, IMUNIDADE, HISTOMORFOMETRIA E HEMATOLOGIA DE <i>Pseudoplatystoma</i> spp. SUPLEMENTADO COM PROBIÓTICO <i>Bacillus subtilis</i>	51
Resumo	53
Abstract	54
Introdução.....	55
Material e Métodos	56
Instalações e Animais	56
Delineamento e ração experimental	57
Manejo dos animais e desempenho zootécnico.....	59
Qualidade da água	59
Análises hematológicas.....	60
Atividade fagocítica	60
Histomorfometria do intestino.....	61
Desafio bacteriano	63
Análises estatísticas.....	64
Resultados e Discussão	64
Qualidade da água	64
Desempenho zootécnico	65
Parâmetros hematológicos.....	67
Capacidade fagocítica.....	69
Histomorfometria intestinal	70
Desafio bacteriano	71
Referências	74
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

RESUMO

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do probiótico *Bacillus subtilis* em surubins *Pseudoplatystoma* spp. Para tanto o estudo foi dividido em três etapas. A primeira etapa teve como objetivo determinar o tempo de maior atividade fagocítica dos macrófagos na cavidade celomática dos surubins, por meio da técnica de inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizados 24 surubins com peso de $15,6 \pm 4,3$ g. Os tempos de incubação foram de uma, duas e três horas, além de um grupo controle, sendo utilizados seis peixes por grupo. Verificou-se que o tempo experimental de duas horas foi suficiente para promover a migração e ativação máxima dos macrófagos. Na segunda etapa foi avaliado o poder de inibição *in vitro* de três probióticos: *B. subtilis*, *Weissella cibaria* e *Lactobacillus plantarum* frente ao crescimento de três patógenos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* e *Aeromonas hydrophila*. O antagonismo das culturas probióticas *in vitro* foi avaliado utilizando a metodologia Disco Ágar Difusão. Os resultados demonstraram que o *B. subtilis* apresentou halos de inibição para a cepa de *A. hydrophila*; o probiótico *W. cibaria* produziu halo de inibição para as cepas de *E. durans* e *A. hydrophila*; e o probiótico *L. plantarum* produziu halos de inibição para as cepas *P. aeruginosa*, *E. durans* e *A. hydrophila*. Na última etapa, o objetivo foi avaliar o desempenho produtivo, parâmetros hematológicos, imunológicos, taxa de sobrevivência após desafio bacteriano com *A. hydrophila* e caracterizar histomorfometricamente o intestino dos surubins alimentados com dieta suplementada de *B. subtilis*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições. Foram utilizados 300 animais, com peso inicial de $24,5 \pm 3,6$ g, distribuídos em 30 caixas, com um tratamento controle e quatro níveis de inclusão do probiótico 10, 20, 30 e 40 g de *B. subtilis* 1×10^9 UFC. Os resultados demonstraram que houve efeito da suplementação na capacidade fagocítica, consumo de ração, hematócrito, eritrócitos e linfócitos na coleta de 10 dias, hemoglobina, CHCM, eosinófilo e neutrófilo aos 20 dias (coleta final). Na análise das vilosidades intestinais, a regressão indicou efeito linear negativo dos níveis de probiótico sobre a altura dos vilos intestinais. A suplementação

com *B. subtilis* não influenciou o desempenho produtivo e a sobrevivência após desafio bacteriano em surubins.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, antagonismo, *Bacillus subtilis*, histomorfometria, imunidade, índices produtivos, surubins

ABSTRACT

This work was carried out with the objective to evaluate the influence of probiotic *Bacillus subtilis* in surubins *Pseudoplatystoma* spp. To conducting this study, it was necessary to divide it into three stages: the first step objective was to determine the time of greater phagocytic activity of macrophages in the cavity celomatica of surubins, by the yeast inoculation technique the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Were used 24 surubins with average weight of 15.6 ± 4.3 g, incubation times were one, two and three hours, in addition to a control group, were used six fish per group. It was found that the time trial of two hours was sufficient to promote the migration and optimal activation of macrophages. In the second step was observed power inhibition *in vitro* of three probiotic: *B. subtilis*, *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* compared to the growth of three pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* and *Aeromonas hydrophila*. The antagonism of probiotic cultures *in vitro* was evaluated using the agar disk diffusion method. The results demonstrated that *B. subtilis* showed inhibition halos for the strain of *A. hydrophila*; the Probiotic *W. cibaria* produced inhibition zone for the strains of *E. durans* and *A. hydrophila*; and the probiotic *L. plantarum* produced inhibition halos for the three pathogenic strains. In last stage, the objective was to evaluate the zootechnical performance, hematological parameters, immunological, rate of survival after bacterial challenge with *A. hydrophila* and characterize histomorphometrically the intestine of surubins supplemented with *B. subtilis*. The experimental design was a completely randomized design with five treatments and six repetitions. Were used 300 animals, with initial average weight of 24.5 ± 3.6 g, distributed into 30 aquarium, with a control treatment and four levels of inclusion of probiotics 10, 20, 30 and 40 g of *B. subtilis* 1×10^9 CFU. The results demonstrated that there was no effect of supplementation in phagocytic

capacity, feed consumption, hematocrit, red blood cells and lymphocytes in the harvest of 10 days, hemoglobin, MCHC, eosinophils and neutrophils in final harvest. In the analysis of the intestinal villi, the regression indicated negative linear effect of levels of probiotics on the villi height intestinal. Supplementation of *B. subtilis* did not influence the productive performance and the survival after bacterial challenge in surubins.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, antagonism, *Bacillus subtilis*, histomorphometry, immunity, index zootechnical, surubins

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 – Introdução

O crescimento da piscicultura no Brasil, assim como em outros países, levou a atividade a trabalhar em regime de criação intensivo e superintensivo, utilizando-se de sistemas com altas densidades populacionais, fornecimento de altas quantidades de ração e diferentes procedimentos de manejo, sendo estes, fatores críticos para o aumento da ocorrência de doenças e infecções. Na piscicultura, as infecções bacterianas são consideradas uma das principais causas de mortes e o controle destes patógenos é normalmente realizado por meio da administração de antibióticos (Barros, 2012).

O uso massivo e indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos na piscicultura, não só com finalidades terapêuticas, mas também, profiláticas e como agente promotor de crescimento utilizando dosagens subterapêuticas, aumenta o risco de resistência a determinadas cepas bacterianas (Verschuere *et al.*, 2000). Segundo Montes (1993), esta prática pode comprometer uma parcela da microbiota normal do trato gastrointestinal, levando a diminuição considerável ou até mesmo a dizimação dessa microbiota.

Parte desses antimicrobianos, adicionados à dieta ou administrados de outra forma aos animais, especialmente em aves, foram proibidos na União Européia em função da possibilidade de provocar resistência em organismos patogênicos importantes para os seres humanos, reações de hipersensibilidade e até mesmo por propriedades cancerígenas. Muitos países têm seguido esse exemplo, e, como consequência, diversos produtos estão sendo avaliados como alternativas para substituí-los (Mentem, 2001).

Considerando estas adversidades e a sensibilização dos consumidores diante desta questão, diversos aditivos alimentares estão sendo avaliados como alternativa de substituição ao uso de antibióticos e quimioterápicos promotores de crescimento, destacando a utilização dos produtos naturais (Hisano *et al.*, 2004). Em função dos problemas advindos da utilização de antibióticos, sejam eles de ordem econômica, metodológica ou sanitária, devem ser estudadas alternativas que diminuam a utilização de quimioterápicos na aquicultura, sem perdas na produtividade e qualidade final

do alimento (Meurer, 2005). A utilização de bactérias que beneficiam o hospedeiro, como os probióticos, são uma alternativa ao uso de antibióticos na aquicultura e vem ganhando espaço na indústria nos últimos anos (Gatesoup, 1999).

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos suplementados aos alimentos, que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora em seu balanço intestinal (Fuller, 1989), na prevenção de doenças (Mattar *et al.*, 2001) e constituem uma das alternativas ao uso de antibióticos no controle de doenças (Nikoskelainen *et al.*, 2001). Kesarcodi-Watson *et al.* (2008) ressaltaram que os probióticos em peixes são microrganismos vivos que podem servir como suplementos dietéticos para melhorar o crescimento e a resposta imune.

De acordo com Nayak (2010), entre os numerosos efeitos benéficos dos probióticos, destacam-se nos peixes teleósteos, os relacionados ao sistema imunológico, como o incremento da resposta imune e resistência às doenças. Os parâmetros mais estudados são aqueles que interagem com as células do sistema imunológico, tais como células mononucleares fagocíticas (monócitos e macrófagos), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células natural killer (NK) para melhorar a resposta imune inata. Certos probióticos podem aumentar o número de eritrócitos, granulócitos, macrófagos e linfócitos em diferentes espécies de peixes (Irianto e Austin, 2002).

Com base neste mecanismo de ação e suas vantagens, este trabalho propõe a determinação do tempo de migração de macrófagos na cavidade celomática dos surubins, avaliar o antagonismo *in vitro* de diferentes probióticos frente à diferentes patógenos de peixes e a inclusão crescente do probiótico *Bacillus subtilis* na dieta de surubins *Pseudoplatystoma* spp. para avaliar os efeitos na imunidade, desempenho produtivo, hematologia, histologia do intestino e resistência após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

2 – Revisão de literatura

2.1 – *Pseudoplatystoma* spp.

Surubim é o nome popular dado às espécies de peixes do gênero *Pseudoplatystoma*, pertencentes à ordem Siluriformes. A ordem Siluriformes

inclui o chamado peixe de couro, cuja principal característica externa é a ausência de escamas sobre o corpo, revestido apenas de pele espessa, ou coberto parcial ou totalmente com placas ósseas. Apresentam barbilhões, em geral, um par maxilar e dois pares mentonianos e, frequentemente, o primeiro raio da nadadeira dorsal e das peitorais se constitui de um acúleo forte e pungente (Britski *et al.*, 1988).

O gênero *Pseudoplatystoma* pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas (Amazônica, do Prata e São Francisco). As principais espécies que representam este gênero são: *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim, pintado), *Pseudoplatystoma fasciatum* (cachara), atualmente chamado de *P. reticulatum* de acordo com a classificação de Buitrago-Suarez e Burr (2007), e *Pseudoplatystoma tigrinum* (caparari, pirambucu) (Welcomme, 1985).

Os surubins possuem cabeça grande e achatada, coloração escura no dorso, ranhuras esbranquiçadas nas laterais, pintas na extensão do corpo e ventre claro, e uma característica que os diferenciam de outras espécies é o formato do corpo comprido e achatado (Sales *et al.*, 2005). A boca é grande, subterminal com pré-maxilar ligeiramente projetado na frente da mandíbula (Britski *et al.*, 2007).

Os surubins são peixes de hábito alimentar estritamente piscívoro (Marques, 1993), de hábitos bentônicos e noturnos (Britski *et al.*, 2007). Por ter hábito alimentar piscívoro, sua alimentação é onerosa, requerendo alta tecnologia. Desta forma, devido à sua preferência alimentar, os surubins precisam receber o condicionamento ou treino alimentar, realizado durante o período de alevinagem, para aceitar rações ou alimentos secos após essa fase. Dependendo da fase de desenvolvimento, aceitam rações em forma de peletes flutuantes (extrusada) de 2,0 a 15,0 mm (Kubitza *et al.*, 1998).

Os surubins são peixes de água doce de alto valor comercial, considerados produtos nobres por apresentarem carne saborosa, com baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares. Possuem, assim, grande importância econômica e social em suas regiões de ocorrência (Crepaldi, 2008). Estas características atendem às preferências atuais e futuras

do mercado de pescado e fazem de sua carne um produto de elevado padrão, atendendo o comércio em boa parte do país, e exportado para os Estados Unidos e países da União Européia (Baldisserotto e Gomes, 2010).

O surubim, encontrado no mercado nacional e produzido em escala industrial é resultante do cruzamento entre o *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Em conceitos de melhoramento genético, o cruzamento entre duas espécies diferentes resulta em um híbrido, com objetivo de explorar a expressão da heterose obtida no cruzamento (Crepaldi *et al.*, 2006).

Dentro da piscicultura, a criação de híbridos tem recebido especial atenção, com o objetivo de aproveitar as características favoráveis das espécies parentais, bem como melhorar o seu desempenho para a exploração em cativeiro. Ou seja, a hibridação como técnica praticada em explorações aquícolas, pretende melhorar o nível de produção, de maneira que o sistema se torne mais competitivo e o produto final tenha maior aceitação por parte dos consumidores (Botero *et al.*, 2004).

O *Pseudoplatystoma* spp. teve sua primeira produção expressiva em 1998, com uma produção de 329 toneladas, e em 11 anos cresceu 546 %, atingindo a marca de 2.126,7 toneladas em 2009. Importante ressaltar que o crescimento da produção no período de 2006 a 2009 foi de 94 %, mostrando-se bastante consistente e expressivo, com uma média anual de crescimento de 19,4 % (MPA, 2010).

Aliados ao rápido crescimento no cultivo desta espécie, possibilidades de ocorrência de doenças e infecções, problemas com baixo desempenho produtivo e condições estressantes na criação podem se tornar frequentes. Neste contexto, houve a necessidade de buscar alternativas para aperfeiçoar a criação e aumentar a resistência desta espécie através da inclusão de bactérias probióticas em sua dieta.

2.2 – Probiótico

A definição mais utilizada para probiótico foi expressa por Fuller (1989), que definiu o probiótico como um microrganismo vivo suplementado na dieta, o qual beneficia o animal hospedeiro por melhorar o balanço microbiano intestinal. Em 2001, a FAO/OMS, intitulou o termo probiótico como,

microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro.

De acordo com Silva *et al.* (2006), os probióticos são definidos como suplementos alimentares, contendo microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal, podendo assumir uma função alternativa de promotor de crescimento. Recentemente, Kesarcodi-Watson *et al.* (2008) ressaltaram que os probióticos em peixes são microrganismos vivos que podem servir como suplementos dietéticos para melhorar o crescimento e a resposta imune.

Os probióticos podem ser benéficos de várias formas, agindo separadamente ou em combinação com outras cepas probióticas. Dentre as ações, estão incluídas a inibição de patógenos (produção de compostos antagônicos), concorrência pela adesão de sítios, competição por nutrientes e funções imunoestimulatórias, assim como os benefícios nutricionais alimentares para melhorar a digestibilidade e para facilitar sua digestão (Fuller, 1989; Bomba *et al.*, 2002). A ação benéfica do uso de probióticos ocorre de duas formas: (1) na determinação de melhores índices produtivos, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar; (2) redução da colonização intestinal por alguns patógenos, como por exemplo, as salmonelas (Castro, 2003).

A eficácia do probiótico é estritamente dependente da quantidade e das características das cepas de microrganismos utilizadas na elaboração deste aditivo alimentar. Diversos estudos para a seleção de probióticos foram publicados durante a última década, entre eles destacam-se os microrganismos como o *Bacillus* spp., bactérias produtoras de ácido láctico e outras bactérias gram-negativas (Irianto e Austin, 2002).

De acordo com Vine *et al.* (2004), a seleção de probióticos para a aquicultura é usualmente baseada no antagonismo entre microrganismos probióticos e agentes patogênicos. Estes mesmos autores ainda salientam que esta seleção pode ser realizada por meio de outros critérios como: o gênero ao qual pertence a 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 e a capacidade de produzir compostos antimicrobianos metabolicamente ativos no intestino (Collins *et al.*, 1998).

Entre os microrganismos 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* e *Streptococcus thermophilus* (Collins *et al.*, 1998).

Nikoskelainem *et al.* (2001), estudando o potencial de seis probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. rhamnosus* LC 705, *Bifidobacterium lactis* Bb12, e *Lactobacillus johnsonii* La1) de uso humano e um de uso animal (*Enterococcus faecium* Tehobak) para peixes, demonstraram a habilidade de adesão à mucosa, resistência à bile dos peixes, bem como a supressão do crescimento de patógenos como *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* e *Flavobacterium psychrophilum*, o que revela a possibilidade de aplicação destes microrganismos como probióticos.

A administração conjunta de *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus plantarum*, por meio de alimentação seca ou viva, promoveu a colonização do intestino de larvas de sea bream, *Sparus aurata*, e a diminuição da mortalidade dos animais durante a larvicultura e alevinagem (Carnevali *et al.*, 2004). Panigrahi *et al.* (2005) observaram o efeito da inclusão do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* na dieta de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, relatando o incremento do sistema imune.

A utilização de *Saccharomyces cerevisiae*, como probiótico para tilápia-do-nilo durante o período de reversão sexual e submetidas a um desafio sanitário, promoveu a colonização do intestino dos peixes pelas bactérias probióticas. Contudo, a utilização deste probiótico não influenciou no desempenho e na sobrevivência dos animais (Meurer *et al.*, 2006).

Algumas cepas de leveduras podem colonizar o intestino de truta arco-íris e turbot em concentrações acima de 4×10^4 células por grama de intestino sem afetar o peixe (Andlid *et al.*, 1995). Andlid *et al.* (1998) isolaram a cepa de

Saccharomyces cerevisiae CBS 7764 e determinaram que a adesão ao muco intestinal da truta arco-íris depende do estado fisiológico do tecido e que estas crescem rapidamente tendo o muco como única fonte de energia e nutrientes.

Estudo realizado por Lara-Flores *et al.* (2003) demonstrou que a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* para alevinos de tilápia-do-nilo como promotor de crescimento, melhorou o crescimento e a eficiência alimentar, sugerindo que a levedura é um promotor de crescimento adequado para a tilápia. Apesar do uso da levedura como probiótico apresentar efeitos significantes em humanos e animais, seus efeitos são pouco estudados na aquicultura (Patra e Mohamed, 2003).

Ao estudar a influência do uso de diferentes dosagens do poliprobótico comercial Estibion® no crescimento de carpa comum, *Cyprinus carpio*, na fase de recria, Graef e Mondardo (2006) relataram que, nas condições experimentais testadas (dosagens 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 % da dieta), o uso do probiótico não propiciou melhorias no desempenho produtivo (ganho de peso, comprimento e conversão alimentar).

Embora seja necessária a realização de mais pesquisas com este suplemento, os estudos demonstraram que os probióticos podem ser um método alternativo, tanto para o controle e prevenção de diversas doenças causados por agentes patogênicos, quanto para o crescimento e desempenho de peixes na aquicultura (Sugita *et al.*, 1998; Lara-Flores *et al.*, 2003; Heo *et al.*, 2013).

2.2.1 – Probiótico *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* constituem um diversificado grupo em forma de bastonete, gram positivas e não patogênicas (Ninawe e Selvin 2009) e são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias extracelulares e antimicrobianas contra uma variedade de microrganismos (Korenblum *et al.*, 2005; Zokaeifar *et al.*, 2012). Os *Bacillus* têm como característica a formação de esporos resistentes, permitindo uma maior viabilidade após o processamento de rações e altas taxas de sobrevivência após exposição ao ácido gástrico, tornando-se um potencial probiótico para a aquicultura (Hong, *et al.*, 2005).

A aquicultura tem usado amplamente o *Bacillus* como probiótico na criação de camarão, *Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon* (Decamp *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013), e de alguns peixes como *Ictalurus punctatus* (Queiroz e Boyd, 1998) e *Oncorhynchus mykiss* (Nikoskelainen, 2003).

Kumar *et al.* (2006) observaram maior sobrevivência em carpa *Labeo rohita* alimentada com *Bacillus subtilis*, submetida à injeção intraperitoneal com *Aeromonas hydrophila*. Além disso, estudo realizado por Kumar *et al.* (2008), demonstrou que o uso da bactéria *Bacillus subtilis* aumenta a resposta imune em carpa *Labeo rohita*. Raida *et al.* (2003), concluíram que a administração dos probióticos *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformes* na dieta para truta arco-íris em sistema de criação, proporcionaram maior sobrevivência frente o desafio com o patógeno *Yersinia Ruckeri*.

A ingestão de uma quantidade adequada de *Bacillus subtilis* é suficiente para repor a microbiota normal do intestino após o uso de antibióticos ou de doença grave (Green, *et al.*, 1999). *Bacillus* sp. estirpe NM 12 isolados do conteúdo intestinal do peixe costeiro japonês *Callionymus* sp., produziu substâncias antimicrobianas de amplo espectro (Sugita *et al.*, 1998). *Bacillus subtilis* OR 1 foi eficaz como probiótico no controle da infecção causada por *Aeromonas* sp. em truta arco-íris (Newaj-Fyzul *et al.*, 2007).

O *Bacillus* sp. pode ser usado como agente de biocontrole no intestino dos peixes e nas águas de criação, uma vez observada a alta atividade do probiótico contra o patógeno *Vibrio vulnificus* (Sugita *et al.*, 1998). Moriarty (1998) apontou em criação de camarões, que o uso do probiótico *Bacillus* sp. ocasionou maior sobrevivência dos animais e promoveu a diminuição de *Vibrio* sp. na água dos tanques e no sedimento.

O uso de probióticos pode ser uma alternativa para melhorar os benefícios dos processos químicos e biológicos em tanques de criação de peixes (Boyd e Queiroz, 2004). Desta forma observa-se que o probiótico *Bacillus* tem apresentado vários efeitos positivos na aquicultura.

2.3 – Sistema imune e fagócitos

Os peixes sofrem influência de diversos fatores no meio em que vivem, dificultando determinar o seu estado imunológico. Nas espécies de peixes que

são produzidas em pisciculturas, há interesse especial em aumentar a resistência às doenças e incrementar tecnologias que atuam no sistema imune.

O sistema imune em peixes é dividido em duas partes, o sistema imune inato (não específico) e o adquirido (específico), e estes se complementam (Roitt *et al.*, 1998). O sistema adquirido pode ser classificado de acordo com suas respostas, podendo ser humoral, e ou, celular (Secombes, 1996; Iwana e Nakanishi, 1996).

O sistema imune inato dos peixes difere de outros vertebrados na defesa de patógenos pelas respostas inata e adquirida, pois acredita-se que as respostas inatas sejam mais expressivas (Urbinati e Carneiro, 2004).

Diversos estímulos como patógenos (bactérias, vírus, fungos ou parasitos) ou uma substância estranha ao organismo podem ativar o sistema inato. O sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa, que consiste em 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 (Magnadóttir, 2006; Aoki *et al.*, 2008).

Durante a ativação do sistema imune inato, o sistema adquirido é acionado por mecanismos específicos de defesa que produzirão a memória imunológica, bloqueando o desenvolvimento de nova infecção caso seja estimulada novamente por um mesmo patógeno ou substância estranha (Wedemeyer, 1996).

O sistema adquirido é caracterizado pelos processos realizados no sistema imune inato. Os processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias são alguns exemplos do sistema adquirido (Secombes, 1996; Claire *et al.*, 2002; Boshra e Sunyer, 2006).

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). Desta forma o sangue está diretamente ligado ao estado imunológico do peixe. 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).

As células brancas ou leucócitos do sangue são classificados como leucócitos agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, denominados linfócitos e monócitos; e, segundo, os granulócitos, que se classificam em neutrófilos, basófilos e eosinófilos (Storer e Usinger, 1979).

Os linfócitos 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). 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 (Falcon, 2007). Sob condições apropriadas, estas células deixam o sistema vascular e completam sua maturação, tornando-se macrófagos maduros, nos tecidos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos, também desempenham papel importante na regulação do sistema imune, já que eles, além de contribuírem com os mecanismos inatos, estão também envolvidos com a resposta específica de defesa (Verlhac e Gabaudan, 1997). Estas células são capazes de reconhecer patógenos e degradá-los por meio do mecanismo de fagocitose, que se constitui como a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos.

Os basófilos também exercem função fagocítica, mas não o fazem com a mesma intensidade e atividade que os neutrófilos e eosinófilos. Os basófilos estão ligados a peixes que são portadores de parasitoses e nas reações alérgicas (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Os eosinófilos constituem um grupo especial de leucócitos, com capacidade de apreender e lesar patógenos

extracelulares maiores, como parasitos que são muito grandes para serem eliminados por fagocitose (Klein, 1990).

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). A regulação da resposta imunológica é o efeito benéfico mais comumente relatado em peixes quando suplementados com probióticos. No entanto, existem numerosos mecanismos de imunidade em peixes, e o entendimento destas respostas do sistema imune é um fator chave para a utilização de novas tecnologias, como o uso de probiótico.

3 – Objetivos

O trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial de utilização da bactéria *Bacillus subtilis* como probiótico para juvenis de surubim, através de parâmetros hematológicos, imunológicos, histológicos e produtivos.

Objetivos específicos foram:

- Determinar o tempo de maior atividade fagocítica dos macrófagos na cavidade celomática de juvenis de surubins;
- Avaliar o antagonismo *in vitro* de bactérias probióticas frente à diferentes patógenos;
- Avaliar o desempenho zootécnico dos surubins suplementados com o probiótico *Bacillus subtilis*;
- Avaliar os parâmetros hematológicos dos surubins suplementados com probiótico *Bacillus subtilis*;
- Verificar o teor de glicose do plasma sanguíneo dos surubins suplementados com probiótico *Bacillus subtilis*;
- Avaliar a atividade fagocítica dos macrófagos na cavidade celomática dos surubins suplementados com probiótico *Bacillus subtilis*;
- Caracterizar histomorfometricamente o intestino dos surubins suplementados com probiótico *Bacillus subtilis*;
- Avaliar o efeito da suplementação com probiótico *Bacillus subtilis* na resistência dos surubins após desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*.

4 - Referências Bibliográficas

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 *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.128-136, 2008.

ANDLID, T.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; GUSTAFSSON, L. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Microbial Ecology**, v.30, p.321-334, 1995.

ANDLID, T.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; GUSTAFSSON, L. Yeast isolates from intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.7, n.2, p.115-126, 1998.

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.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2 Ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. 608 p.

BARROS, C. N. **Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766)**. Recife: UFRPE, 2012. 58p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

BOMBA, A., NEMCOVA, R., MUDROŇA, D., GUBA, P. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v.13, p.121-126. 2002.

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.

BOTERO, M.; FRESNEDA, A.; MONTOYA, A. F.; ANGEL, M. O. Descripción del desarrollo embrionario de zigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Rev. Col. Cienc. Pec.** v.17, p.38-45, 2004.

BOYD, C.E.; QUEIROZ, J.F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 533p. 2004.

BRITISKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os**

peixes da bacia do São Francisco. 3. ed. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, p.115. 1988.

BRITISKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 227 p. 2007.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma Bleeker* (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-38, 2007.

CARNEVALI, O.; ZAMPONI, M.C.; SULPIZIO, R.; Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. **Aquaculture International**, v.12, p.377-386, 2004.

CASTRO, J.C. **Uso de aditivos e probióticos em rações animais**. In: Ferreira, C.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Teixeira, P.C., França, F.M., Dias, D.C. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34: 12-18. 2003.

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

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

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, Â. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. D. The Brazilian catfish in Brazil aquaculture. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 30, p.150-158, 2006.

CREPALDI, D.V. **Ultra-sonografia em surubins (*Pseudoplatystoma corruscans*): avaliação de parâmetros reprodutivos e características de carcaça**. Belo Horizonte: UFMG, 2008. 59 p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W.; LAVENS, P. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 334–338, 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**. Jaboticabal: CAUNESP, 2007.146p. Tese (Doutorado). – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, 2001.

FULLER, R. A review: probiotic in man and animals. **Journal Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.1034-1039. 1989.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147 – 165, 1999.

GRAEF, A.; MONDARDO, M. Influência do probiótico no crescimento das carpas comum (*Cyprinus carpio*, 1758) na fase de recria. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**. v.2, n.11, p.1-8, 2006.

GREEN, D. H.; WAKELEY, P. R.; PAGE, A.; BARNES, A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4288-4291, 1999.

HEO, W. S.; KIM, Y.; KIM, E.; BAI, S. C.; KONG, I. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 376-379, p. 20-24, 2013.

HISANO, H.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FREIRE, E.S.; GONÇALVES, G.S.; FERRARI, J.E.C. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v.26, p.171-179, 2004.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813–835, 2005.

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.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control *furunculosis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.333-342. 2002.

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

KLEIN, J. **Immunology**. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA, p. 311-334, 1990.

KORENBLUM, E.; DER WEID, I.; SANTOS, A. L.; ROSADO, A. S.; SEBASTIÁN, G. V.; COUTINHO, C. M.; MAGALHÃES, F.C.; PAIVA, M. M.; SELDIN, L. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 667-675, 2005.

KUBTIZA, F.; CAMPOS, J.L.; BRUM, J.A. Produção intensiva de surubins no Projeto Pacu. Ltda e Agropex Ltda. In: **Anais da Aquicultura**, v.1, p.393-407, 1998.

KUMAR R.; MUKHERJEE S. C.; RANJAN, R.; KAYAK, 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

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.

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMAN-MENDEZ, B.E.; Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, p.193-201, 2003.

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

MARQUES, E. E. **Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto rio Paraná**. Curitiba: UFPR, 1993. 104p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

MATTAR, A.F.; DRONGOWSKI, R.A.; CORAN, A.G. et al. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery International**, v.17, p.265-268. 2001.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. 38: 151-157. 2001.

MEURER, F. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como probiótico para as fases iniciais do cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Maringá: UEM, 2005. 85p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

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, n.5, p.1881-1886, 2006.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, **Produção pesqueira e aquícola - estatística 2008-2009**. 30p. 2010.

MONTES, A. J.; PUGH, D.G. The use of the probiotics in food-animal practice. **Veterinary Medicine**, v. 88, p. 282-288, 1993.

MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164. p.351 – 358, 1998.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, v.29, 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, n. 5, p. 1699-1706, 2007.

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; BYLUND, G.; SALMINEN, S.; LILIUS, E. M. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 443–452, 2003.

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

NINAWA, A. S.; SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 43–66, 2009.

O’ SULLIVAN, D.J. Methods of analysis of the intestinal microflora. In: TANNOCK, G.W. (Ed), **Probiotics: A critical review**. **Horizont Scientific Press**. Wymondham, England, p. 23 – 44, 1999.

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.

PATRA, S.K.; MOHAMED, K.S. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. **Aquaculture International**, v.11, p.505-514, 2003.

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

RAIDA, M. K.; LARSEN, J. L.; NILSEN, M. E. E BUCHMANN, K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BIOPLUS2B). **Journal of Fish Diseases**, v.26, p.495 – 498, 2003.

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.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Immunology**. 5º ed. London, Mosby. 1998.

SALES, D. S.; CASEIRO, A.; FIRETTI, R.; WAKATSUKI, A. **O desenvolvimento recente da aquicultura brasileira**. In: Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p. 252-256, 2005.

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

SILVA, C. A.; HOSHI, E. H.; PACHECO, G. D.; BRIGANÓ, M. V. Avaliação de probióticos (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho dos leitões. **Semina**, v.27, p.133 – 140, 2006.

SILVA, E. F.; SOARES, M. A.; CALAZANS, N. F. VOGLEY, J. L.; DO VALLE, B. C.; SOARES, R.; PEIXOTO, S. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 44, 13-21, 2013.

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

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. São Paulo Companhia Editora Nacional, 1979. 757p.

SUGITA, H.; HIROSE, Y.; MATSUO, N. E DEGUCHI, Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**, v.165, p.269 – 280, 1998.

TORT, L., BALASCH, J. C., MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Revista Immunologia**, v.22, n.3, p.277-286, 2003.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.171-193.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. **Brochure** nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland. 1997.

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

VINE A, N.G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.145-152, 2004.

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

WELCOMME, R. L. **River fisheries**. Roma: FAO, (FAO Fisheries Technical Papers, 262). 330 p. 1985.

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.

ZOKAEIFAR, H.; BALCÁZAR, J. L.; SAAD, C. R.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAMC, K.; ARSHAD, A.; NEJAT, N. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, p. 683-689, 2012.

1 **CAPÍTULO – 2**

2 O artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista: PESQUISA
3 AGROPECUÁRIA BRASILEIRA – PAB

4 **Hematologia e tempo de migração de macrófagos em surubim *Pseudoplatystoma***
5 ***spp.* frente a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae***

6 André Luiz Nunes

7 Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em
8 Zootecnia, Unidade Universitária de Aquidauana, Rod. Aquidauana-UEMS,
9 km 12 - C.P. 25, CEP 79200-000 Aquidauana, MS, Brasil.

10 Email: andre_lnunes@hotmail.com

11 Resumo – Neste trabalho foi estudado o tempo de maior atividade fagocítica dos
12 macrófagos na cavidade celomática de surubim *Pseudoplatystoma* spp. e as alterações
13 hematológicas e bioquímica após a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*. Foram
14 utilizados 24 peixes com peso de $15,6 \pm 4,3$ g. O delineamento foi inteiramente
15 casualizado, e os tempos de incubação foram de uma, duas e três horas, e um grupo
16 controle, sendo utilizados seis peixes por grupo. Na inoculação foi injetado
17 intracelomaticamente 1,5 mL de solução de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na
18 concentração de $9.000 \text{ células mm}^{-3}$. As variáveis hematológicas e bioquímica
19 analisadas foram: hematócrito, hemoglobina, número total de eritrócitos, volume
20 corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagem total de
21 trombócitos e contagem total e diferencial de leucócitos e glicose. Foram avaliados a
22 capacidade fagocítica e o índice fagocítico de macrófagos. Foi realizada análise de
23 variância ($P < 0,05$) e as médias significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a
24 5%. O tempo de incubação de duas horas mostrou ser suficiente para promover a
25 migração e ativação máxima dos macrófagos. A concentração de eosinófilo foi menor
26 nos tempos de duas e três horas quando comparados ao grupo controle. A concentração

27 de linfócitos foi maior três horas após a inoculação em relação ao grupo controle e ao
28 tempo de uma hora. Não houve diferença significativa para a glicose plasmática entre os
29 tempos de incubação.

30 Termos para indexação: aquicultura, fagocitose, hematologia, imunidade, levedura,
31 peixe.

32

33 **Time of macrophage migration catfish *Pseudoplatystoma* spp. front of a inoculation**

34 ***Saccharomyces cerevisiae***

35 André Luiz Nunes

36 State University of Mato Grosso do Sul, Postgraduate Program in Animal Science,

37 University of Unit Aquidauana, Rodovia Aquidauana-UEMS, km 12 - C.P. 25,

38 CEP 79200-000 Aquidauana, MS, Brazil.

39 Email: andre_lnunes@hotmail.com

40 Abstract – In this work we studied the time of greater phagocytic activity of
41 macrophages in the celomatic cavity in surubim *Pseudoplatystoma* spp., and
42 hematological and biochemistry alterations. Were used 24 fish with average weight of
43 15.6 ± 4.3 g. The design was completely randomized, and the incubation times were of
44 one, two and three hours, and a control group, were used six fish per group. For
45 inoculation, 1.5 mL of solution of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in concentration of
46 $9,000 \text{ cells mm}^{-3}$ was injected intraperitoneally. The hematological and biochemistry
47 variables were analyzed: hematocrit, hemoglobin, total number of cells erythrocytes,
48 mean corpuscular volume, concentration of mean corpuscular hemoglobin average, total
49 count of thrombocytes, total count and differential leukocyte count and glucose, the
50 phagocytic capacity and phagocytic index the macrophages were evaluated. Was

51 performed variance analysis ($P < 0.05$) and the mean significant were compared by the
52 test of Tukey to 5 %. The incubation period of two hours proved to be enough to
53 promote migration and optimal activation of macrophages. The concentration of
54 eosinophils were lower in the times, of two and three hours when compared to the
55 control group. The concentration of lymphocytes were higher on the time of three hours
56 in relation to the control group and the time of one hour. There was no significant
57 difference in plasma glucose between the time of incubation.

58 Index terms: phagocytosis, hematology, immunity, yeast, fish.

59

60 **Introdução**

61 Os peixes sofrem influência de diversos fatores no meio em que vivem,
62 dificultando estabelecer padrões do seu estado imunológico. Nas espécies de peixes que
63 são produzidas em pisciculturas, há interesse especial em aumentar a resistência às
64 doenças e desenvolver tecnologias que potencializam seu sistema imune.

65 O sistema imune é dividido em duas partes que se complementam: o sistema
66 imune inato (não específico) e o adquirido (específico) (Roitt et al., 1998). O sistema
67 imune inato dos peixes difere de outros vertebrados, por ser mais importante que a
68 resposta adquirida (Saurabh & Sahoo, 2008). Uma defesa celular não específica do
69 sistema imune inato é a fagocitose, e os macrófagos têm um papel importante nesse
70 processo, fazendo a fagocitose do corpo estranho e protegendo o hospedeiro (Verlhac &
71 Gabaudan, 1997).

72 A fagocitose é considerada a resposta celular na qual os fagócitos, por meio de
73 movimentos amebóides, ingerem partículas maiores que $0,5 \mu\text{m}$ utilizando mecanismos
74 que envolvem e degradam microrganismos, partículas poluentes e irritantes

75 (Rabinovitch, 1995). É realizada por fagócitos, como macrófagos fixos, residentes ou
76 células como macrófagos presentes em todos os compartimentos do corpo e que,
77 portanto, possui um papel importante no estágio inicial de infecções, e também são os
78 primeiros fagócitos a encontrar o microrganismo invasor (Do Vale et al., 2002).

79 Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e são
80 componentes da imunidade inata, com funções bem estabelecidas na resposta primária à
81 patógenos, assim como na homeostase dos tecidos, coordenação da resposta imune
82 adaptativa, inflamação, resolução e reparo (Geissmann et al., 2010). Várias partículas
83 são utilizadas para verificar a atividade dos macrófagos, dentre as principais estão as
84 leveduras e as bactérias, e o monitoramento da ingestão é usado para avaliar o efeito
85 desses contaminantes nos macrófagos (Bols et al., 2001).

86 Uma das maneiras de avaliar o sistema imunológico é por meio da estimulação
87 da atividade fagocítica pela injeção de leveduras na cavidade celomática dos peixes,
88 onde se pode determinar o tempo de migração de macrófagos, a capacidade fagocítica e
89 o índice fagocítico (Silva et al., 2002, 2005). A incubação de leveduras pode variar entre
90 as espécies de peixes, e para estimar o índice fagocítico e a capacidade fagocítica é
91 necessário realizar a contagem de leveduras no momento de maior migração de
92 macrófagos e de maior número de leveduras fagocitadas (Dias et al., 2011).

93 O presente estudo foi realizado com o objetivo de definir o tempo de maior
94 atividade fagocítica dos macrófagos na cavidade celomática do surubim
95 *Pseudoplatystoma* spp. por meio da técnica de inoculação da levedura *Saccharomyces*
96 *cerevisiae* e verificar possíveis alterações hematológicas e bioquímica após a incubação
97 da levedura.

98

99

Material e Métodos

100 O experimento foi conduzido no Laboratório de Ictioparasitologia da
101 Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, na Unidade Universitária de
102 Aquidauana, MS. Foram utilizados 24 juvenis do surubim *Pseudoplatystoma* spp. com
103 peso de $15,6 \pm 4,3$ g e comprimento de $14,5 \pm 1,5$ cm. Adotou-se um delineamento
104 inteiramente casualizado, e os tempos de incubação foram de uma, duas e três horas, e
105 um grupo controle, sendo utilizados seis peixes (repetição) por tempo. Os animais
106 foram anestesiados com eugenol a 50 mg.L^{-1} , e em seguida, foi injetado na cavidade
107 celomática 1,5 mL de solução salina estéril (0,07 %) com a levedura *Saccharomyces*
108 *cerevisiae* na concentração de $9.000 \text{ células mm}^{-3}$. Os peixes do grupo controle não
109 receberam qualquer substância intracelomática e também foram avaliados quanto aos
110 parâmetros hematológicos e bioquímico.

111 Os peixes foram acondicionados, individualmente, em aquários redondos de
112 dois litros, com aeração para o controle de oxigênio, termostato para controle da
113 temperatura e cronômetros digitais para o controle dos tempos de incubação.

114 Decorrido o período de incubação, os animais foram anestesiados novamente, e
115 retiradas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, utilizando seringas e agulhas
116 descartáveis e banhadas em EDTA a 3 %. Os parâmetros hematológicos avaliados
117 foram: porcentagem de hematócrito (Ht) pelo método de microhematócrito de
118 Goldenfarb et al. (1971); hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina de
119 Collier (1944); contagem do número de eritrócitos (Er) em câmara de Neubauer
120 utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato em microscópio óptico (400
121 X). A partir dos dados de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos foram

122 calculados o volume corpuscular médio (VCM) = $Ht \times 10/Er$ e a concentração de
123 hemoglobina corpuscular média (CHCM) = $Hb \times 100/Ht$.

124 Foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicata de cada animal,
125 secas ao ar e coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright (Tavares-
126 Dias & Moraes, 2003) para a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de
127 trombócitos e leucócitos (Hrube & Smith, 1998). A glicose plasmática foi determinada
128 por meio de Kit Comercial LabTest® e para isso, seringas e agulhas descartáveis
129 utilizadas na colheita sanguínea foram banhadas no antiglicolítico glistab.

130 Após a colheita de sangue, os animais foram eutanasiados por aprofundamento
131 do plano anestésico e feita uma incisão ventral, onde foi realizado o lavado da cavidade
132 peritoneal com 1,5 mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline – pH 7,2). O líquido
133 contendo as células inflamatórias (macrófagos) foi aspirado com pipeta de Pasteur e em
134 seguida centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante
135 foi desprezado e o restante do precipitado foi depositado entre lâmina e lamínula e
136 observado em microscopia de contraste de fase (400 X) para contagem do número de
137 fagócitos.

138 A capacidade fagocítica (CF) e o índice fagocítico (IF) de macrófagos nos três
139 diferentes tempos de incubação, foram calculados segundo metodologia de Silva et al.
140 (2002, 2005), em que a Capacidade Fagocítica (CF) é a porcentagem de um
141 determinado tipo celular que esta fagocitando, expressa pela equação: $CF = (\text{número de}$
142 $\text{macrófagos fagocitando} / \text{total de macrófagos contados}) \times 100$; e o Índice Fagocítico
143 (IF) é o número médio de leveduras no interior das células fagocíticas em que são
144 contadas 100 células, cuja fórmula é: $IF = n^{\circ} \text{ total de leveduras no interior dos fagócitos}$
145 $/ n^{\circ} \text{ total de fagócitos ativos}$.

146 Para a análise estatística dos dados, os resultados dos parâmetros
147 hematológicos, bioquímico, capacidade fagocítica e índice fagocítico, foram submetidos
148 ao Software Estatístico R versão 2.13.0, e realizada a análise de variância (ANOVA)
149 com nível de significância 5 %. Quando apresentaram diferenças significativas, as
150 médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

151

152 **Resultados e Discussão**

153 Para a série vermelha (hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos),
154 índices hematimétricos e glicose (Tabela 1) foi observado efeito dos diferentes
155 tratamentos ($p < 0,01$) somente para a concentração de hemoglobina corpuscular média
156 (CHCM), com valores elevados no tempo de duas horas. No entanto, os valores do
157 grupo controle e do tempo de uma hora foram estatisticamente inferiores aos valores
158 obtidos nos tempos de duas e três horas após a inoculação.

159 Os valores de hemoglobina e o número de eritrócitos do presente estudo não
160 apresentaram diferença estatística entre os tempos, no entanto, as mesmas variáveis
161 estão ligadas à resposta do estímulo estressante do tempo de incubação, pois o estresse
162 causa um aumento da demanda energética. Assim, valores de hemoglobina tendem a
163 serem maiores para tentar suprir o aumento do consumo de oxigênio por intermédio do
164 transporte do mesmo na corrente sanguínea (Tavares-Dias & Moraes, 2004), com isto o
165 CHCM está intimamente ligado aos números de eritrócitos e hemoglobina.

166 Na série branca (Tabela 2), o número total de linfócitos foi superior ($p < 0,05$)
167 para o tempo de incubação de três horas em relação ao grupo controle e o tempo de uma
168 hora. Os linfócitos são células altamente diferenciadas, com capacidade de resposta
169 frente aos estímulos imunológicos (Ellis, 1977) e participam dos processos

170 inflamatórios (Finn & Nielson,1971). Dias et al. (2011), Jensch-Junior et al. (2006) e
171 Martins et al. (2008) encontraram aumento no número de linfócitos na corrente
172 sanguínea após imunoestimulação com microrganismos.

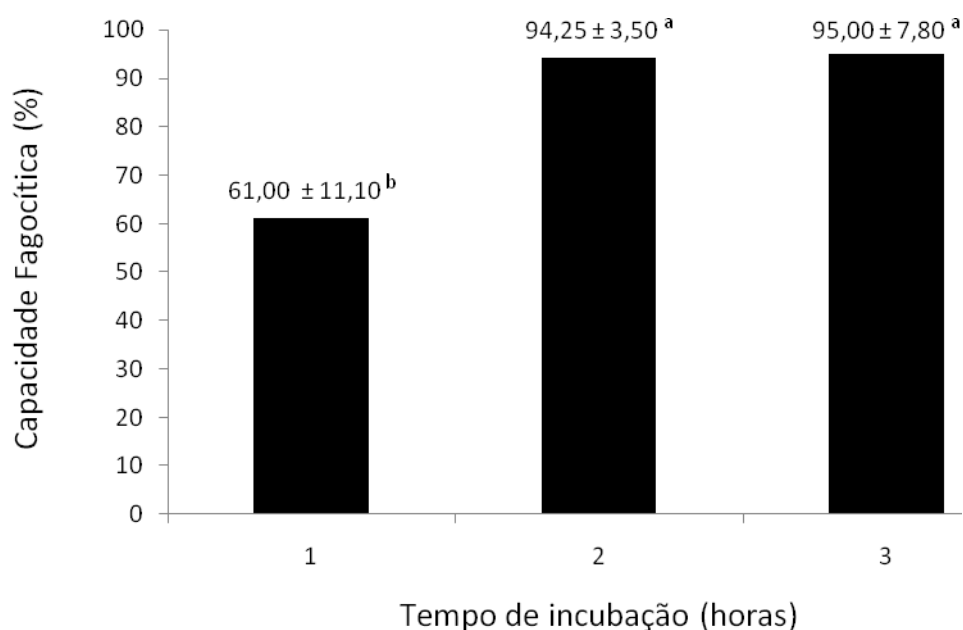
173 Os eosinófilos, muitas vezes, estão ausentes no sangue periférico dos peixes, e
174 quando estão presentes, aparecem com uma frequência relativamente baixa (Tavares-
175 Dias & Moraes, 2004). A maior porcentagem de concentração de eosinófilo circulante
176 no sangue foi no grupo controle, mostrando que nos grupos que receberam a levedura,
177 estas células estão em trânsito no sangue, pois durante o processo inflamatório ou de
178 infecção, elas podem estar migrando para os focos para a realização de processos
179 fagocíticos ou de lesionamento. Os eosinófilos constituem um grupo especial de
180 leucócitos, com capacidade de apreender e lesar patógenos extracelulares maiores, como
181 parasitos que são muito grandes para serem eliminados por fagocitose (Klein, 1990).

182 Os eosinófilos diferiram significativamente do grupo controle com os tempos
183 de duas e três horas. Assim, os eosinófilos podem estar migrando para o foco
184 inflamatório, no caso, a cavidade celomática com levedura, diminuindo a sua
185 concentração na corrente sanguínea. Este grupo de células pode estar ligado tanto a
186 resposta inata, quanto a resposta específica do sistema imune de peixes, no entanto, com
187 os dados apresentados em *Pseudoplatystoma* spp. este grupo celular provavelmente
188 esteja envolvido mais acentuadamente na resposta imune inata.

189 Observou-se diferença ($p \leq 0,05$) para a CF e IF entre o tempo experimental de
190 uma hora quando comparado com duas e três horas. Entretanto, não houve diferença
191 estatística entre os tempos de duas e três horas para essas variáveis (Figura 1 e 2). O fato
192 dos valores serem menores para CF e IF no tempo de incubação de uma hora, pode estar

relacionado com a velocidade de migração dos macrófagos para a cavidade celomática e a sua ativação frente às leveduras.

O tempo experimental de duas horas mostrou ser suficiente para promover a migração e ativação máxima dos macrófagos (Figura 1 e 2). Dias et al. (2011) verificaram para o peixe nativo matrinxã *Brycon amazonicus*, que duas horas de incubação foram suficientes para a migração de macrófagos. Existe uma grande variação nos tempos de incubação entre as espécies e vários fatores podem interferir nesse processo, como temperatura, estresse, imunoestimulante utilizado, alimentação, entre outros (Dias et al., 2011).



202

Figura 1. Valores médios percentuais da capacidade fagocítica de juvenis de surubim nos diferentes tempos de incubação de leveduras. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

206

Os resultados demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de estimular a migração de macrófagos para a cavidade celomática em todos os períodos estudados, sendo um bom imunoestimulante para o estudo da fagocitose. O resultado foi

semelhante ao encontrado por Jensch-Junior et al. (2006), que avaliaram a levedura na estimulação de macrófagos em *Prochilodus scrofa*.

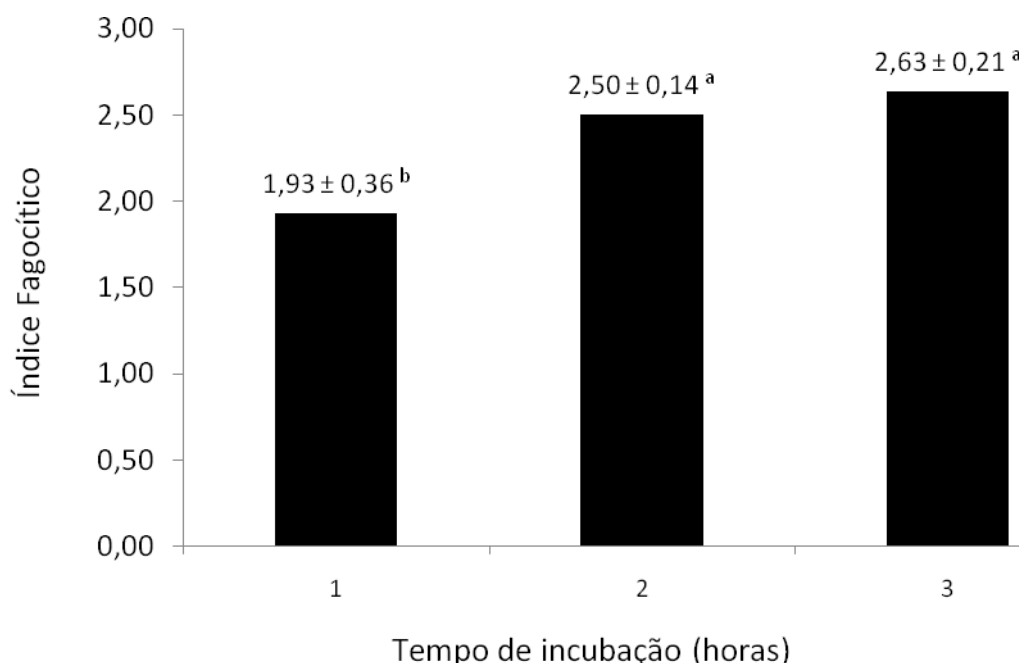


Figura 2. Valores médios dos índices fagocíticos de juvenis de surubim nos diferentes tempos de incubação de leveduras. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conclusão

1. O tempo de duas horas foi suficiente para promover a migração e ativação máxima dos macrófagos na cavidade celomática de juvenis de surubins *Pseudoplatystoma* spp.

2. A concentração de eosinófilos no sangue foi menor nos tempos de duas e três horas quando comparados ao grupo controle.

3. A concentração de linfócitos foi maior para o tempo de inoculação de três horas em relação ao grupo controle e ao tempo de uma hora.

227 4. A concentração de glicose plasmática não alterou entre os tempos de
228 incubação.

229 Agradecimentos

230 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
231 pela concessão da bolsa de mestrado. À Pirai piscicultura pela doação dos animais.

232 Referências

- 233 BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN R.C.; LEE, L.E.J. Ecotoxicology and
234 innate immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**. v.25, p.853-
235 873, 2001.
- 236 DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R.; SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA,
237 M. J. T.; ROMAGOSA, E. Tempo de migração dos macrófagos em matrinxã, *Brycon*
238 *amazonicus*, por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.
239 **Acta Amazonica**. v.41, n.3, p.421 -424, 2011.
- 240 DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. The Professional phagocytes of sea bass
241 (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and
242 macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish Selfish immunology**,
243 v.13, n.3, p.1-16, 2002.
- 244 ELLIS, A.E. The leucocytes of fish: a review. **Journal of Fish Biology**, v.11, p.453-
245 491, 1977.
- 246 FINN, J. P.; NIELSON, N. O. The inflammatory response of rainbow trout. **Journal of**
247 **Fish Biology**, v.3, p.463-478, 1971.
- 248 GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K.
249 Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, v.327, p.656-
250 661, 2010.
- 251 GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in
252 the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of**
253 **Clinical Pathology**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.
- 254 JENSCH-JUNIOR, B. E.; PRESSIONOTTI, L. N.; BORGES, J. C. S.; SILVA, J. R. M.
255 C. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa*
256 (Steindachner, 1881). **Aquaculture**, v.251, p.509–515, 2006.
- 257 KLEIN, J. Immunology. **Blackwell Scientific Publications Inc.**, Massachusetts, p.311-
258 334, 1990.

- 259 MARTINS, M. L.; VIEIRA, F. N.; JERÔNIMO, G. T.; MOURIÑO, J. L. P.; DOTTA,
260 G.; SPECK, G. M.; BEZERRA, A. J. M.; PEDROTTI, F. S.; BUGLIONE-NETO, C.
261 C.; PEREIRA-JUNIOR, G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia
262 experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Fish Physiology Biochemistry**, v.35,
263 n.1, p. 219-222, 2008.
- 264 RABINOVITCH, M. Phagocytosis. **Trends in Cell Biology**, v.5, p. 85–88, 1995.
- 265 ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 5ed. London, Mosby, 1998.
- 266 SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate
267 immune system. **Aquaculture Research**, v.39, p.223-239, 2008.
- 268 SILVA, J.R.M.C.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES J.C.S.; JENSCH-JUNIOR B.E.
269 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*
270 (Richardson, 1844) at 0°C. **Polar Biology**, v.28, n.4, p.326-328, 2005.
- 271 SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; POTO-NETO,
272 L.R.; BORGES, J.C.S. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of
273 *Notothenia coriiceps*. **Journal Fish Biology**, v.60, p.466-478, 2002.
- 274 TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão
275 Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144p.
- 276 VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Brochure nº
277 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.
- 278
- 279
- 280
- 281
- 282
- 283
- 284
- 285
- 286
- 287
- 288

Tabela 1 - Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) dos parâmetros hematológicos e de glicemia do surubim *Pseudoplatystoma* spp. nos diferentes tempos de inoculação de leveduras.

Tempo	HTC (%)	HB (g dL ⁻¹)	ER (10 ⁶ uL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (g dL ⁻¹)	GLIC (g dL ⁻¹)
Controle	21,83 $\pm$ 4,07	3,94 $\pm$ 0,92	1,07 $\pm$ 0,19	211,10 $\pm$ 18,12	16,80 $\pm$ 1,60 ^b	33,05 $\pm$ 7,19
1h	23,50 $\pm$ 1,98	4,03 $\pm$ 0,46	1,07 $\pm$ 0,10	224,07 $\pm$ 17,11	17,12 $\pm$ 1,32 ^b	31,10 $\pm$ 3,29
2h	19,67 $\pm$ 3,28	4,91 $\pm$ 0,94	1,11 $\pm$ 0,18	163,28 $\pm$ 19,45	24,50 $\pm$ 1,01 ^a	28,84 $\pm$ 3,17
3h	17,00 $\pm$ 1,37	4,05 $\pm$ 0,55	0,91 $\pm$ 0,07	191,39 $\pm$ 23,89	23,37 $\pm$ 2,17 ^a	46,00 $\pm$ 4,52

HTC = hematócrito; HB = taxa de hemoglobina; ER = número de eritrócitos; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; GLIC = glicose. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) dos leucócitos de surubins *Pseudoplatystoma* spp. nos diferentes tempos de inoculação de leveduras.

Grupos	MON (%)	LIN (%)	BAS (%)	EOS (%)	NEU (%)	CGE (%)	LI (%)
Controle	0,00	29,25 $\pm$ 2,37 ^b	4,00 $\pm$ 1,07	7,25 $\pm$ 0,69 ^a	55,67 $\pm$ 4,16	3,17 $\pm$ 1,08	0,67 $\pm$ 0,40
1h	0,00	34,33 $\pm$ 2,70 ^b	2,42 $\pm$ 0,93	5,67 $\pm$ 1,12 ^{ab}	53,00 $\pm$ 3,38	2,92 $\pm$ 0,79	1,67 $\pm$ 1,04
2h	0,08 $\pm$ 0,08	40,83 $\pm$ 4,98 ^{ab}	3,42 $\pm$ 0,77	2,83 $\pm$ 0,75 ^b	47,00 $\pm$ 5,09	5,50 $\pm$ 1,01	0,33 $\pm$ 0,25
3h	0,08 $\pm$ 0,08	51,25 $\pm$ 3,38 ^a	1,50 $\pm$ 0,59	3,00 $\pm$ 0,68 ^b	42,00 $\pm$ 3,46	2,17 $\pm$ 0,70	0,00

MON = monócitos; LIN = linfócitos; BAS = basófilos; EOS = eosinófilo; NEU = neutrófilo; CGE = célula granulocítica especial; LI= leucócitos imaturos; Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

1 **CAPÍTULO – 3**

2 O artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista: PESQUISA
3 AGROPECUÁRIA BRASILEIRA – PAB

4 **Avaliação de bactérias probióticas candidatas para o surubim *Pseudoplatystoma*** 5 **spp.: inibição *in vitro* de microrganismos patogênicos**

6 André Luiz Nunes

7 Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em
8 Zootecnia, Unidade Universitária de Aquidauana, Rod. Aquidauana-UEMS,
9 km 12 - C.P. 25, CEP 79200-000 Aquidauana, MS, Brasil.

10 Email: andre_lnunes@hotmail.com

11 Resumo - Os probióticos são considerados uma alternativa ao uso de antibióticos no
12 controle de patógenos na aquicultura. O objetivo do trabalho foi avaliar o poder de
13 inibição *in vitro* dos probióticos *Bacillus subtilis*, *Weissella cibaria* e *Lactobacillus*
14 *plantarum*, frente ao crescimento das bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*,
15 *Enterococcus durans* e *Aeromonas hydrophila*. Foram também realizados antibiogramas
16 com tetraciclina e florfenicol contra as mesmas bactérias patogênicas. Neste teste
17 qualitativo foi utilizada a técnica de Disco Agar Difusão para avaliar o antagonismo dos
18 probióticos e antibióticos. Os diâmetros dos halos foram mensurados (mm) com
19 paquímetro e a avaliação foi registrada pela presença ou ausência do halo de inibição.
20 Os resultados demonstraram que somente o *L. plantarum* e a tetraciclina produziram
21 halos de inibição para todas as cepas patogênicas. Os probióticos *B. subtilis* e *W. cibaria*
22 não produziram halos de inibição para a bactéria patogênica *P. aeruginosa*, e a mesma
23 se mostrou resistente ao antibiótico florfenicol. A *A. hydrophila* é um dos principais
24 patógenos na criação de *Pseudoplatystoma* spp. e todos os probióticos e antibióticos
25 apresentaram halos de inibição para esta cepa.

26 Termos para indexação: Aquicultura, *Aeromonas hydrophila*, Antagonismo, *Bacillus*
 27 *subtilis*, Bactéria patogênica, Florfenicol, Probiótico

28

29 **Probiotic bacteria to surubim *Pseudoplatystoma* spp.: in vitro inhibition of**
 30 **pathogenic microorganisms**

31 André Luiz Nunes

32 State University of Mato Grosso do Sul, Postgraduate Program in Animal Science,

33 University of Unit Aquidauana, Rodovia Aquidauana-UEMS, km 12 - C.P. 25,

34 CEP 79200-000 Aquidauana, MS, Brazil.

35 Email: andre_lnunes@hotmail.com

36 Abstract – Probiotics are considered an alternative to the use of antibiotics in the control
 37 of pathogens in aquaculture. The objective of this study was to evaluate the power of
 38 inhibition *in vitro* of probiotics *Bacillus subtilis*, *Weissella cibaria* and *Lactobacillus*
 39 *plantarum*, compared to the growth of pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*,
 40 *Enterococcus durans* and *Aeromonas hydrophila*. Were also carried out antibiograms
 41 with tetracycline and florfenicol against the same bacteria. In this qualitative test was
 42 used the technique of Disk Agar diffusion to evaluate the antagonism of probiotics and
 43 antibiotics. The diameters of the halos were measured (mm) with a pachymeter and the
 44 assessment was registered by the presence or absence of the inhibition zone. The results
 45 demonstrated that only the *L. plantarum* and tetracycline produced inhibition halos for
 46 all the pathogenic strains. The probiotics *B. subtilis* and *W. cibaria* did not produce
 47 inhibition halos for the pathogenic bacterium *P. aeruginosa*, and the same proved
 48 resistant to the antibiotic florfenicol. The *A. hydrophila* is one of the main pathogens in

49 the creation of *Pseudoplatystoma* spp., and all the probiotics and antibiotics showed
50 inhibition halos for this strain.

51 Index terms: *Aeromonas hydrophila*, antagonism, *Bacillus subtilis*, bacteria pathogenic,
52 Florfenicol, Probiotic.

53 **Introdução**

54 O surubim, *Pseudoplatystoma* spp. produzido no Brasil e comercializado no
55 mercado nacional e internacional é um peixe híbrido resultante do cruzamento entre o
56 *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*.

57 O *Pseudoplatystoma* spp. teve sua primeira produção expressiva em 1998, com
58 uma produção de 329 toneladas, e em 11 anos cresceu 546 %, atingindo a marca de
59 2.126,7 toneladas em 2009. Importante ressaltar que o crescimento da produção no
60 período de 2006 a 2009 foi de 94 %, mostrando-se bastante consistente e expressivo,
61 com uma média anual de crescimento de 19,4 % (MPA, 2010).

62 É um dos peixes que possui um alto valor econômico, devido às características
63 da carne e ao rendimento de carcaça, se tornando um produto com grande aceitação nos
64 mercados interno e externo (Crepaldi et al., 2008). Em sistemas de produção intensiva,
65 possui elevados índices de desempenho zootécnico, se tornando competitivo com outras
66 espécies nativas e exóticas.

67 Em razão das qualidades zootécnicas e organolépticas do surubim, houve um
68 rápido crescimento na criação desta espécie, e junto com este crescimento, a
69 probabilidade de ocorrência de doenças e infecções bacterianas também aumentaram,
70 sendo a última, considerada uma das principais causas de mortes dos peixes. A
71 administração de antibióticos é normalmente realizada para o controle destes patógenos,
72 entretanto, o uso dessas substâncias pode gerar o aparecimento de cepas de bactérias

73 resistentes, além de implicações negativas relacionadas com a saúde humana e o meio
74 ambiente (Vine et al., 2004a; Garcia e Massam, 2005).

75 Uma alternativa ao uso de antibióticos na aquicultura, que vem ganhando
76 espaço na indústria nos últimos anos é a utilização de bactérias que beneficiam o
77 hospedeiro, os probióticos (Gatesoup, 1999). Os probióticos em peixes são
78 microrganismos vivos que podem servir como suplementos dietéticos para melhorar o
79 crescimento, a resposta imune, a resistência frente a patógenos (Kesarcodi-Watson et
80 al., 2008) e controlar eventuais patógenos (Gomez-Gil et al., 2000; Olafsen, 2001).

81 De acordo com Vine et al. (2004b), a seleção de probióticos para a aquicultura
82 é usualmente baseada no antagonismo entre microrganismos e agentes patogênicos. O
83 antagonismo pode ser fundamentado em duas teorias: quando ocorre a produção de
84 compostos inibitórios e na competição pelos nutrientes dos probióticos quando
85 confrontados com microrganismos patogênicos (Aly et al., 2008; Sorroza et al., 2012).
86 Segundo Vaseeharan & Ramasamy (2003) atividade antibacteriana é definida como a
87 zona inibitória de crescimento formada ao redor do disco de ágar sobrepostos.

88 As bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas como probióticos na
89 aquicultura (Timmerman, 2004). Mohamed e Refat (2011) observaram atividade
90 antagonista produzida frente a *Flavobacterium columnare* em tilápia-do-nilo
91 *Oreochromis niloticus* suplementada com *Bacillus subtilis*.

92 Outro grupo utilizado como probiótico, são as bactérias ácido lácticas,
93 encontradas na microbiota natural de organismos aquáticos (Hagi et al., 2004), como os
94 *Lactobacillus* e *Weissella*. Jatoba et al. (2008) verificaram que a bactéria *Lactobacillus*
95 *plantarum* isolada da tilápia-do-nilo, possui efeito probiótico, pois inibiu bactérias
96 patogênicas, colonizou o trato intestinal e melhorou a resposta inespecífica do sistema

97 immune deste peixe. Mouriño et al. (2011) isolaram do surubim a bactéria probiótica
98 *Weissella cibaria* e verificaram resposta positiva nos parâmetros hematológicos e
99 imunológicos da espécie.

100 Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial *in*
101 *vitro* de inibição das bactérias probióticas *Bacillus subtilis*, *Weissella cibaria* e
102 *Lactobacillus plantarum* e dos antibióticos tetraciclina e florfenicol frente às cepas de
103 bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* e *Aeromonas*
104 *hydrophila*.

105 **Material e Métodos**

O ensaio para verificar o antagonismo das bactérias probióticas frente aos patógenos foi conduzido no Laboratório de Camarões Marinhos, do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os probióticos utilizados foram o *Bacillus subtilis* (C-3102 – DSM 15554 e FERM BP-1096), sendo este um probiótico comercial isolado originalmente do solo, e duas bactérias ácido-láticas, a *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) isolada do trato intestinal do surubim e reconhecida como probiótico para surubins por Mouriño et al. (2011) e *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 001-10 DRM 01) isolada e reconhecida como probiótico para tilápias por Jatobá et al. (2008).

As cepas de bactérias patogênicas utilizados neste ensaio foram *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus durans* (ATCC 19492), pertencente à coleção de cultivo do Laboratório de Camarões Marinhos (Universidade Federal de Santa Catarina).

As cepas de bactérias probióticas foram avaliadas pela sua capacidade de
inibição de crescimento das cepas de bactérias patogênicas *in vitro*. Neste teste

121 qualitativo foi utilizada a técnica de Disco Agar Difusão (WDA) descrita por Ramírez et
122 al. (2006).

123 Placas de Petri com meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar
124 (HIMEDIA ®) foram semeadas com as cepas de bactérias probióticas na concentração
125 de 1×10^5 UFC.mL⁻¹ e incubadas a 35°C por 48 horas. Após as 48 horas de crescimento,
126 foram retirados três discos de ágar (1 cm de diâmetro) das placas de Petri contendo as
127 bactérias probióticas. Estes discos de ágar foram colocados invertidos sobre o meio de
128 cultura das placas recém-semeadas com os patógenos em Agar Triptona de Soja (TSA,
129 Oxoid®) e incubadas a 30°C por 24 horas. Cada cepa de patógeno foi semeada em
130 duplicata com os discos de difusão de cada probiótico.

131 Para a comparação qualitativa, foram realizados antibiogramas com tetraciclina
132 e florfenicol frente às mesmas bactérias patogênicas. O antibiograma foi realizado por
133 intermédio da disposição de discos comerciais de papel impregnados com antibiótico,
134 em placas com o meio de cultivo, onde previamente foi semeado o agente bacteriano.
135 Após a realização do procedimento as placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

136 Os diâmetros dos halos foram mensurados (mm) com o auxílio de paquímetro.
137 A avaliação foi registrada pela presença ou ausência do halo de inibição ao redor dos
138 discos segundo Vine et al. (2004b).

139 **Resultados e Discussão**

140 A atividade antimicrobiana *in vitro* de *B. subtilis* (registro Cepa C-3102 –
141 DSM 15554 e FERM BP-1096), *W. cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) e *L. plantarum*
142 (CPQBA 001-10 DRM 01) frente às estirpes de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966),
143 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus durans* (ATCC 19492) foi
144 demonstrada pelos halos de inibição apresentados na Tabela 1.

145 Todos os antibióticos e as bactérias probióticas apresentaram halos de inibição
146 frente à bactéria patogênica *A. hydrophila*. Esta sensibilidade aos probióticos pode estar
147 associada aos compostos produzidos pelas bactérias ácido lácticas, como o peróxido de
148 hidrogênio, ácidos orgânicos e acético, (Lu e Walker, 2001) e pela produção de
149 compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas (Kayalvizhi e Gunasekaran, 2008),
150 produzidas também pelas bactérias do gênero *Bacillus*.

151 As bactérias patogênicas oportunistas, particularmente *Aeromonas* spp. fazem
152 parte da microbiota endógena do trato intestinal de peixes de água doce e são agentes
153 causadores de doenças e elevada mortalidade em criações intensivas (Belém-Costa e
154 Cyrino, 2006). Um estudo realizado por Silva et al. (2012), verificou-se que a
155 septicemia hemorrágica é o principal sinal clínico de bacteriose causado por *A.*
156 *hydrophila* em surubins, e este é um dos principais patógenos causadores de
157 mortalidade em sistemas de produção intensivos com peixes do gênero
158 *Pseudoplatystoma*.

159 A bactéria patogênica *P. aeruginosa* se mostrou resistente ao antibiótico
160 florfenicol, e aos probióticos *B. subtilis* e *W. cibaria*. Por ser uma bactéria gram
161 negativa, a parede celular é formada por uma camada interna fina de peptideoglicano e
162 uma membrana externa constituída de lipopolissacarídeos e proteínas (Mirzoeva et al.,
163 1997), que podem dificultar a ação dos compostos antimicrobianos produzidos pelos
164 probióticos *B. subtilis* e *W. cibaria* e do florfenicol. Este patógeno, provavelmente, foi
165 sensível ao *L. plantarum* devido a produção de algumas substâncias de amplo espectro,
166 como a reutina, produzida por bactérias ácido lácticas. Esta substância é produzida
167 durante o metabolismo anaeróbico da glicose e é capaz de inibir bactérias de vários

gêneros incluindo *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Axelsson et al. 1989).

O florfenicol é um dos únicos antibióticos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em aquicultura, indicado somente para tilápias, *Oreochromis niloticus* e truta, *Oncorhynchus mykiss* no Brasil. O mecanismo de ação tóxica do florfenicol ocorre por meio da interferência na síntese de proteínas das bactérias e inibição da atividade da enzima peptidil transferase (Schering-Plough, 2009). As bactérias gram negativas são, notoriamente resistentes a antibióticos, como o florfenicol, que não conseguem atravessar sua membrana externa (Mandell e Petri, 1996).

A tetraciclina é amplamente utilizada para tratar e prevenir enfermidades na aquicultura, porém, recentemente tem-se observado maior frequência de bactérias resistentes a essa droga, como no estudo realizado por Carneiro et al., (2007) em criações de tilápia. No ensaio *in vitro*, as cepas patogênicas foram sensíveis a este antibiótico.

Entre os probióticos analisados, o *L. plantarum* conferiu halos de inibição frente aos três patógenos e foi responsável pelo único halo de inibição nos testes de antagonismo contra *P. aeruginosa*. De acordo com estes resultados, pode-se comprovar a ação inibitória *in vitro*, exercida pela bactéria ácido láctica sobre as bactérias patogênicas gram negativas e gram positivas.

A suplementação de tilápia-do-nilo com *L. plantarum* é uma forma de controle preventivo de enfermidades bacterianas, já que inibe bactérias patogênicas e melhora a resposta imune (Jatobá et al., 2008). Souza et al. (2010) verificaram que o *L. plantarum* isolado do trato intestinal de juvenis de robalo-peva colonizaram o trato intestinal desta

192 espécie, e definiram que o *L. plantarum* tem potencial para ser utilizado como
193 probiótico na criação de juvenis desta espécie. Vieira et al. (2010) verificaram uma
194 modificação da microbiota bacteriana intestinal dos camarões *Litopenaeus vannamei* na
195 fase de engorda, após a suplementação com *L. plantarum*, aumentando sua resistência
196 após desafio com *Vibrio harveyi*.

197 A *W. cibaria* conferiu halos de inibição contra as cepas patogênicas *E. durans* e
198 *A. hydrophila*. O probiótico *W. cibaria* juntamente com o prebiótico inulina na
199 alimentação de surubins *Pseudoplatystoma* spp., equilibram a relação entre o número de
200 bactérias patogênicas e benéficas da microbiota intestinal, e possivelmente melhoram o
201 sistema imunológico destes animais (Mouriño et al., 2011). As bactérias ácido lácticas
202 fazem parte da microbiota intestinal dos organismos aquáticos e mamíferos. Os
203 principais gêneros pertencentes a esta classe são: *Lactococcus*, *Streptococcus*,
204 *Lactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*,
205 *Pediococcus*, *Lactosphaera* e *Oenococcus* (Carr et al., 2002).

206 A cepa de *B. subtilis* apresentou somente halos de inibição para a cepa
207 patogênica *A. hydrophila*. Estes dados coincidem com Aly et al. (2008), que mostraram
208 que *B. subtilis* possui capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *A. hydrophila* e
209 indicam esta cepa como potencial probiótico para surubins.

210 Segundo Hong et al. (2005), as bactérias formadoras de esporos, como a do
211 gênero *Bacillus*, estão entre o grande número de probióticos pesquisados e utilizados.
212 Esta capacidade de esporular, confere aos *Bacillus* a principal vantagem sobre as
213 bactérias ácido lácticas (Hoa et al., 2000), e durante a elaboração (suportando
214 temperaturas acima de 75°C), transporte e armazenamento das rações (Gil Turnes et al.,
215 1999).

Muitos estudos demonstraram que os resultados dos efeitos dos probióticos *in vitro* não permitem conclusão sobre sua efetividade quando analisados *in vivo*. Vê-se, portanto, que estudos de antagonismo *in vivo* com *Pseudoplatystoma* spp. são necessários para comprovar a eficiência das bactérias probióticas analisadas *in vitro*.

220

221 **Conclusões**

222 1. A cepa de *Lactobacillus plantarum* produziu compostos de ação inibidora de
223 amplo espectro para as cepas patogênicas gram positivas *Enterococcus durans* e gram
224 negativas *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*.

225 2. O probiótico *Weissella cibaria* produziu halo de inibição para as cepas de
226 *Aeromonas hydrophila* e *Enterococcus durans*.

227 3. O probiótico *Bacillus Subtilis* produziu halo de inibição somente para
228 *Aeromonas hydrophila*, e esta é um dos principais patógenos na criação de
229 *Pseudoplatystoma* spp.

230 4. O antibiótico tetraciclina produziu halo de inibição para todas as cepas
231 patogênicas.

232 5. O florfenicol produziu halo de inibição para *Aeromonas hydrophila* e
233 *Enterococcus durans*.

234

235 **Agradecimentos**

236 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
237 pela concessão da bolsa de mestrado. Ao Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC)
238 pela disponibilidade de infraestrutura para a realização do presente trabalho. A empresa
239 UNIQÚMICA Ltda. pela doação do probiótico.

240

Referências

- 241 ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on
242 *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune
243 response and resistance of *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge
244 infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p.128-136, 2008.
- 245 AXELSSON, L. T.; CHUNG T. C.; DOBROGOSZ, W. J.; LINDGREN, S. E.
246 Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*.
247 **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.2, n.2: p.131-136,1989.
- 248 BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila*
249 isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus*
250 (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v.36, n.3, p.281-284, 2006.
- 251 CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JÚNIOR, D. J. Perfil de
252 susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de
253 cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina**
254 **Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 869-876, 2007.
- 255 CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey.
256 **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- 257 CREPALDI D.V. **Ultra-sonografia em surubins (*Pseudoplatystoma corruscans*):**
258 **avaliação de parâmetros reprodutivos e características de carcaça.** 2008. 52p. Tese
259 (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
260 Veterinária, Belo Horizonte.
- 261 GARCIA, A.F.; MASSAM, J.P. Elimination of antibiotics in hatcheries while
262 improving production levels by use of probiotics. **Journal of World Aquaculture**
263 **Society**, Baton Rouge, v.36, p.57-60, 2005.
- 264 GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam,
265 v.180, p.147–165, 1999.
- 266 GIL-TURNES, C.; SANTOS, A. F.; CRUZ, F. W.; MONTEIRO, A. V. Properties of
267 the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of**
268 **Microbiology**, v.30, n.1, p.11-14, 1999.
- 269 GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic
270 bactéria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, Amsterdam,
271 v.191, p.259-270, 2000.
- 272 HAGI, T.; TANAKA, D.; IWAMURA, Y.; HOSHINO, T. Diversity and seasonal
273 changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish.
274 **Aquaculture**, v.234, p.335–346, 2004.
- 275 HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.;
276 AMMENDOLA; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* species

- 277 used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders.
278 **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5241-5247, 2000.
- 279 HONG, H.A.; DUC LE, H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as
280 probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.813-835, 2005.
- 281 JATOBA, A.; VIEIRA, F. D.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.;
282 JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from
283 the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria**
284 **Brasileira**, v.43, p.1201-1207, 2008.
- 285 KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Production and characterization of a low-
286 molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. **Letters in Applied**
287 **Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 600-607, 2008.
- 288 KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L.
289 Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening
290 processes. **Aquaculture**, v.274, p.1-14. 2008.
- 291 LU, L.; WALKER, W. A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the
292 gastrointestinal epithelium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 11245-
293 11305. 2001.
- 294 MANDELL, G. I.; PETRI Jr., W. A. Antimicrobial agents: general considerations. In:
295 THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9. 1996, New York,
296 **International Edition**, New York, NY. 1223 p. 1996.
- 297 MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of
298 propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and
299 motility of bacteria. **Microbiological Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- 300 MOHAMED, M.H.; REFAT, N. A.G. A. Pathological Evaluation of Probiotic, *Bacillus*
301 *subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in Tilapia Nilotica (*Oreochromis Niloticus*)
302 Fish in Sharkia Governorate, Egypt. **Journal of American Science**, v.7, n.2, 2011.
- 303 MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A. B.; SILVA, B. C.; JESUS, G. F.
304 A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation of inulin
305 and *W.cibaria* on haemato-immunological parameters on hybrid surubim
306 (*Pseudoplatystoma* spp.), **Aquaculture Nutrition**, v.17, p.1-8, 2011.
- 307 OLAFSEN, J.A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture.
308 **Aquaculture**, Amsterdam, v.200, p.223-247, 2001.
- 309 SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH. Aquaflor. Florfenicol. **Technical**
310 **Monograph for catfish health professionals**, 2009, 36 p.
- 311 SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.;
312 MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma*
313 *corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*.
314 **Aquaculture Research**, v. 43, p. 908-916, 2012.

- 315 SORROZA, L.; PADILLA, D.; ACOSTA, F.; ROMÁN, L.; GRASSO, V.; VEGA, J.;
 316 REAL, F. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection
 317 of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*.
 318 **Veterinary Microbiology**, v.155, p.369-373, 2012.
- 319 SOUZA, R. M.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C.; ANDREATTA,
 320 E. R.; SEIFFERT, W. Q.; CERQUEIRA, V. R. Seleção de bactéria com potencial
 321 probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*. Poey, 1860)
 322 **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, p. 17 – 24, 2010.
- 323 TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F.M.;
 324 BEYNEN, A.C. Monostrain, multistain and multispecies probiotics - a comparison of
 325 functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**. v.96, p.219–
 326 233, 2004.
- 327 VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. por *Bacillus*
 328 *subtilis* BT23, a possible probiótico treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*.
 329 **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 83-87. 2003.
- 330 VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; MARTINS, M.
 331 L.; SCHLEDER, D. D.; ANDREATTA, E. R.; BARRACO, M. A.; VINATEA, L.A.
 332 Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with
 333 *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n3,
 334 p.631-638, 2010.
- 335 VINE A, N.G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of five
 336 candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus.
 337 **FEMS Microbiology Letters**, 231:145-152. 2004 A.
- 338 VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T.
 339 Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria
 340 on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v.27, p.319-326, 2004 B.

341 **Tabela 1:** Formação dos halos de inibição de bactérias probióticas e de antibióticos
 342 contra cepas de bactérias patogênicas.

Probióticos e antibióticos	Cepas patogênicas		
	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Durans</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+
<i>Weissella cibaria</i>	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-
Tetraciclina	+	+	+
Florfenicol	+	+	-

343 + : produziu halo de inibição; - : não produziu halo de inibição.

CAPÍTULO – 4

O artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista: AQUACULTURE NUTRITION

PROBIÓTICO *Bacillus subtilis* PARA *Pseudoplatystoma* spp.: DESEMPENHO PRODUTIVO, IMUNIDADE, HISTOMORFOMETRIA E HEMATOLOGIA

André Luiz Nunes

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, Unidade Universitária de Aquidauana, Rod. Aquidauana-UEMS,
km 12 - C.P. 25, CEP 79200-000 Aquidauana, MS, Brasil.

Email: andre_lnunes@hotmail.com

RESUMO

Neste experimento objetivou-se avaliar o desempenho produtivo, caracterizar histomorfometricamente o intestino, estimar os parâmetros hematológicos e imunológicos, e avaliar a sobrevivência após desafio contra *Aeromonas hydrophila* em juvenis de surubim *Pseudoplatystoma* spp. alimentados por 20 dias com *Bacillus subtilis*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições com 10 peixes cada. Foram utilizados 300 surubins, com peso inicial de $24,5 \pm 3,6$ g, distribuídos em 30 caixas, com um tratamento controle e quatro níveis de inclusão do probiótico 10, 20, 30 e 40 g de *B. subtilis* (1×10^9 UFC). Aos 10 e 20 dias de suplementação, foram realizadas colheitas de sangue, e a biometria foi realizada no final do experimento (20 dias). Os resultados dos parâmetros hematológicos, produtivos e imunológicos foram submetidos à análise de variância e quando significativos, ao teste de Tukey ($P < 0,05$). Os resultados de altura de vilo foram submetidos à análise de regressão. Para avaliar a sobrevivência após o desafio foi utilizado o modelo linear generalizado com função da ligação logística. Os resultados demonstraram que a suplementação influenciou nos valores de hematócrito, eritrócitos e linfócitos aos 10 dias; e hemoglobina, CHCM, eosinófilo, neutrófilo, capacidade fagocítica e consumo de ração aos 20 dias. Na análise das vilosidades intestinais, a regressão

indicou efeito linear negativo ($Y = 273,5062 - 0,3306 * X$) dos níveis de probiótico sobre a altura dos vilos intestinais. A suplementação com *B. subtilis* não influenciou na sobrevivência após desafio bacteriano dos surubins.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, bactéria probiótica, fagocitose, índices zootécnicos, surubins, vilosidade intestinal

ABSTRACT

In this experiment we evaluated the zootechnical performance, characterized histomorphometrically the intestine, estimate the hematological and immunological parameters and evaluated the survival after bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila* of surubim juveniles *Pseudoplatystoma* spp. fed for 20 days with *Bacillus subtilis*. The experimental design was completely randomized with five treatments and six repetitions. Were used 300 surubins, with initial average weight of 24.5 ± 3.6 g, distributed in 30 aquariums, with a control treatment and four levels of inclusion of probiotics 10, 20, 30 and 40 g of *B. subtilis* 1×10^9 CFU. The results of hematological, immunological and zootechnical parameters, were submitted to analysis of variance and when significant, the Tukey test were used ($P < 0.05$), the results of villous height were submitted to regression analysis and was used generalized linear model with logit link function to evaluate the survival after challenge. The results demonstrated that there was effect of supplementation in phagocytic capacity, feed consumption, hematocrit, red blood cells and lymphocytes in the harvest of 10 days, hemoglobin, CHCM, eosinophils and neutrophils in the finish harvest. In the analysis of intestinal villi, the regression indicated negative linear effect of probiotics levels on the villi height intestinal supplementation *B. subtilis* did not influence the productive performance and survival after bacterial challenge in surubins *Pseudoplatystoma* spp.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, probiotic bacteria, phagocytosis, indexes, surubins, intestinal villi

Introdução

Probiótico é um aditivo que está se tornando cada vez mais popular na aquicultura, principalmente por melhorar a saúde do hospedeiro (Gatesoupe, 1999), a digestibilidade dos alimentos, aumentando seu valor nutricional, e atuar indiretamente no animal através da melhora da qualidade dos parâmetros ambientais (Verschuere et al., 2000).

Um probiótico amplamente utilizado é o *Bacillus* (Silva et al., 2013), gênero de bactérias que constituem um diverso grupo de bastonetes gram positivos, caracterizados por sua habilidade de produzir importantes grupos de metabólitos secundários como antibióticos, bioinseticidas, biocinas, ácidos orgânicos e até enzimas (Olmos, 2003). As enzimas dos *Bacillus* são muito eficientes em romper uma ampla variedade de carboidratos, lipídios e proteínas (Sonnenschein et al., 1993).

Os *Bacillus* têm como característica a formação de esporos resistentes, permitindo uma maior viabilidade após o processamento de rações e altas taxas de sobrevivência após exposição ao ácido gástrico do estômago, tornando-se um potencial probiótico para a aquicultura (Hong, et al., 2005).

São vários os benefícios observados nos peixes após a utilização do probiótico *Bacillus*, como aumento da resposta imune dos animais, maior sobrevivência frente alguns patógenos, reposição da microbiota após uso de antibiótico e produção de substâncias antimicrobianas de amplo espectro (Sugita et al., 1998; Kumar, 2008; Raida et al., 2003; Green, et al., 1999).

Os microrganismos probióticos, por meio de competição física no trato digestório, podem impedir a colonização intestinal por agentes patogênicos

(Tournut,1998). Com isso, diminuem a fixação dos microrganismos patogênicos, levando à proteção das vilosidades e regeneração da mucosa em caso de lesão (Petri, 2000). Sendo assim, diversos componentes têm sido testados para atuar na mucosa intestinal, aumentando a mitose, e assim o tamanho dos vilos (Boleli et al., 2002; Maiorka et al., 2002).

A renovação celular por meio da mitose ou perda de células na base dos vilos é ocasionada pelo desenvolvimento da mucosa intestinal, aumentando a densidade e altura das células epiteliais (Maiorka et al., 2002). Nestes casos de renovação celular, através do aumento da proliferação celular, a digestão e absorção de nutrientes são maximizadas ocorrendo maior ganho de peso (Boleli et al., 2002).

Com base nessas informações, esse trabalho propõe a inclusão crescente do probiótico *Bacillus subtilis* em dietas de surubins *Pseudoplatystoma* spp. para conhecer seus efeitos sobre a imunidade, hematologia, desempenho produtivo, histomorfometria do intestino e resistência frente à desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

Material e Métodos

Instalações e animais

O experimento foi conduzido no setor de piscicultura da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, na Unidade Universitária de Aquidauana, MS - Brasil. As análises hematológicas e imunológicas foram realizadas no Laboratório de Ictioparasitologia e de Química da referida Universidade.

Foram utilizados 300 juvenis de surubim, treinados para receber alimento seco com comprimento e peso de $15,9 \pm 0,8$ cm e $24,5 \pm 3,6$ g,

respectivamente. Os animais foram adquiridos de uma piscicultura comercial e aclimatados durante um período de 10 dias em caixas d'água de 100 litros com fluxo contínuo de água.

Após o período de aclimação, os juvenis foram distribuídos em 30 caixas experimentais (10 peixes em cada) com volume útil de 40 litros e alimentados com as dietas contendo probiótico durante 20 dias.

Delineamento e ração experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e um grupo controle isenta de probiótico, cada um com seis repetições. Foram adicionados na ração experimental quatro níveis do probiótico composto por *Bacillus subtilis*:

Ração controle (sem adição de probiótico);

10 g de *Bacillus subtilis* por kg de ração;

20 g de *Bacillus subtilis* por kg de ração;

30 g de *Bacillus subtilis* por kg de ração;

40 g de *Bacillus subtilis* por kg de ração;

O probiótico comercial contendo *Bacillus subtilis* na concentração de 10^9 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias) foi adicionado nas rações por meio de veículo oleoso (2 % de óleo de soja) para a incorporação da bactéria probiótica ao pelete. Também foi adicionado 2 % de óleo de soja na ração controle.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia durante todo o período experimental. Utilizou-se uma ração comercial extrusada (peletes de 2 a 4 mm)

destinada à peixes carnívoros (Tabela 1 – Ração Comercial). O arraçoamento foi realizado no período matutino entre 5 e 7 horas e no período noturno, entre 18 e 20 horas. Os animais foram alimentados até a saciedade aparente.

Tabela 1. Níveis de garantia da dieta utilizada no estudo, Ração Comercial.

Composição informada	g.kg ⁻¹ de dieta
Proteína Bruta (mín.)	400,0
Extrato Etéreo (mín.)	80,0
Umidade (máx.)	80,0
Matéria Fibrosa (máx.)	60,0
Matéria Mineral (máx.)	120,0
Cálcio (máx.)	16,0
Cálcio (mín.)	10,0

Vitaminas e Minerais: Fósforo (mín.) 8,0000 mg/kg; Magnésio (Max) 2,000 mg/kg; Vitamina A (mín.) 16.000,0000 UI/kg; Vitamina D3 (mín.) 4.500,0000 UI/kg; Vitamina E (mín.) 250,0000 UI/kg; Vitamina B2 (mín.) 32,0000 mg/kg; Vitamina B1 (mín.) 32,0000 mg/kg; Vitamina C (mín.) 350,0000 mg/kg; Niacina (mín.) 170,0000 mg/kg; Vitamina B6 (mín.) 32,0000 mg/kg; Biotina (mín.) 10,000 mg/kg; Ácido Fólico (mín.) 10,000 mg/kg; Vitamina B12 (mín.) 32,0000 mcg/kg; Colina (mín.) 2.000,0000 mg/kg; Manganês (mín.) 50,0000 mg/kg; Zinco (mín.) 150,0000 mg/kg; Ferro (mín.) 150,0000 mg/kg; Cobre (mín.) 20,0000 mg/kg; Cobalto (mín.) 0,5000 mg/kg; Iodo (mín.) 350,0000 mg/kg; Selênio (mín.) 0,7000 mg/kg;

A análise bromatológica (Tabela 2) da ração experimental fornecida no experimento foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal/EMBRAPA OESTE - Dourados, MS; e os níveis de garantia por quilo do produto da ração experimental podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados da análise bromatológica das dietas experimentais.

Matéria Seca (%)	94,18
Proteína Bruta (%)	39,53
Extrato Etéreo (%)	5,27
Fibra bruta (g)	6,00
Cromo (mg/L)	0,00
Cálcio (%)	2,40
Magnésio (%)	0,25

Cobre (mg/L)	20,87
Ferro (mg/L)	608,86
Manganês (mg/L)	106,29
Zinco (mg/L)	218,78

Após a inclusão dos níveis de probióticos na ração, antes do início do fornecimento das rações aos peixes, uma amostra de cada ração experimental foi submetida à análise microbiológica (Tabela 3) no Laboratório de Microbiologia da Empresa Comércio e Indústria Uniquímica Ltda – Diadema, São Paulo. A eficácia dos probióticos depende da concentração bacteriana encontrada na ração, com isto, análises microbiológicas das rações experimentais foram realizadas antes do início da alimentação dos peixes a fim de quantificar *Bacillus subtilis* na ração.

Tabela 3. Resultado das análises microbiológicas das rações experimentais suplementadas com probiótico *Bacillus subtilis*.

Tratamentos	Ração experimental	Log 10
Controle	ND	ND
10 g	$8,40 \times 10^6$	6,9262
20 g	$1,70 \times 10^7$	7,2240
30 g	$3,30 \times 10^7$	7,5218
40 g	$3,50 \times 10^7$	7,5378

ND: *not detectable* ($< 2,3 \times 10^1$)

Após as análises microbiológicas, foi verificado que o *Bacillus subtilis* foi quantificado de todas as rações na concentração esperada, levando em consideração a inclusão do produto. Não foram detectadas colônias de *Bacillus*

subtilis na dieta controle, indicando que não houve contaminação entre o tratamento controle e os demais tratamentos.

Manejo dos animais e desempenho produtivo

Para avaliação do desempenho zootécnico dos juvenis foram realizadas biometrias para obtenção de dados de peso e comprimento, no início e ao final do período experimental. Os índices zootécnicos avaliados foram:

- a) Conversão alimentar aparente (CAA): consumo de ração/ganho de peso;
- b) Ganho de peso (g): peso final - peso inicial;
- c) Ganho de biomassa (kg): biomassa final - biomassa inicial;
- d) Taxa de eficiência proteica (%): relação entre o ganho de biomassa e o consumo de proteína bruta (CPB), onde CPB é a percentagem de proteína bruta (PB) da ração experimental multiplicado pelo consumo total de ração;
- e) Consumo de ração (g): consumo médio de ração por peixe durante o período experimental.
- f) Taxa de Crescimento Específico: $(\log \text{ natural do peso final (g)} - \log \text{ natural do peso inicial (g)}) / \text{Período experimental (dias)} \times 100$;

Qualidade da água

O monitoramento da qualidade de água foi realizado a cada três dias pelo período da manhã durante o experimento. As médias e os desvios padrão

dos valores dos parâmetros da qualidade da água (Tabela 4) encontram-se dentro da faixa de conforto recomendada para peixes (Sipauba-Tavares, 1995).

Tabela 4: Média e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água durante o experimento.

Temperatura (°C)	24,8	± 1,8
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	4,9	± 0,4
pH	6,9	± 0,3
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	193	± 15,2

Análises hematológicas

Foram realizadas colheitas de sangue no início do experimento (coleta basal), aos 10 dias e ao final do período de alimentação (20 dias). Foram colhidas amostras de sangue de doze peixes por tratamento (dois por repetição).

Os surubins foram anestesiados com eugenol (50 mg.L⁻¹) para a colheita de sangue, e as alíquotas foram coletadas por punção do vaso caudal, utilizando seringas e agulhas descartáveis banhadas em EDTA a 3 %.

Os parâmetros hematológicos avaliados foram: porcentagem de hematócrito (Ht) pelo método de microhematócrito de Goldenfarb et al. (1971); hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina de Collier (1944); contagem do número de eritrócitos (Er) em câmara de Neubauer utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato em microscópio óptico (400 X). A partir dos dados de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos foram

calculados o volume corpuscular médio (VCM) = $Ht \times 10/Er$ e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) = $Hb \times 100/Ht$.

Foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicata de cada animal, secas ao ar e coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2003) para a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de trombócitos e leucócitos (Hrube e Smith, 1998).

Atividade Fagocítica

Ao término do período de alimentação com as dietas suplementadas com o probiótico foi realizada a avaliação do sistema imune. Seis surubins por grupo experimental, foram anestesiados em eugenol a 50 mg.L^{-1} , e em seguida, foi injetada, intraperitonealmente, a solução de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ($9.000 \text{ cél. mm}^{-3}$) de acordo com Ranzani-Paiva et al. (2008).

Após duas horas de incubação da levedura, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico e feita uma incisão ventral, onde foi realizado o lavado da cavidade peritoneal com 1,5 mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline – pH 7,2). O líquido contendo as células inflamatórias (macrófagos) foi aspirado com pipeta de Pasteur e em seguida centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o restante do precipitado foi depositado entre lâmina e lamínula e observado em microscopia de contraste de fase (400 X) para contagem do número de fagócitos.

A capacidade fagocítica (CF) e o índice fagocítico (IF) de fagócitos foram calculados segundo metodologia de Silva et al. (2002, 2005), em que a Capacidade Fagocítica (CF) é a porcentagem de um determinado tipo celular que esta fagocitando, expressa pela equação: $CF = (\text{número de fagócitos fagocitando} / \text{total de fagócitos contados}) \times 100$; e o Índice Fagocítico (IF) é o número médio de leveduras no interior das células fagocíticas onde são contadas 100 células, cuja fórmula é: $IF = \text{n}^\circ \text{ total de leveduras no interior dos fagócitos} / \text{n}^\circ \text{ total de fagócitos ativos}$.

Histomorfometria do intestino

Ao término do período de suplementação com o probiótico foi realizada a morfometria da mucosa intestinal no Laboratório de Patologia Veterinária- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Foram utilizados dois exemplares de cada repetição, perfazendo um total de doze peixes por tratamento.

Os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico, seguido de dissecação medular e submetidos a uma incisão longitudinal no ventre para a exposição dos órgãos. Porções de aproximadamente 3 cm de comprimento foram recolhidas do intestino médio (4 cm abaixo da junção do estômago com o intestino), cortadas longitudinalmente com tesoura microcirúrgica, fixadas abertas com a parede interna do órgão orientada para cima sobre pranchas de isopor, mergulhadas em solução fixadora de *Bouin* por seis horas, sendo este substituído por álcool 70%, permanecendo conservadas até o momento da inclusão.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas pela passagem em séries crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, para a obtenção de cortes transversais com o auxílio de micrótomo em espessura de 5 µm. De cada amostra de intestino, foram confeccionadas cinco lâminas semiseriadas, contendo cinco cortes seriados cada, as quais foram submetidas à coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina (H.E.) e analisadas em microscópio de luz. Este material foi submetido à captura de imagem com objetiva de 10X realizada no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em microscópio óptico Zeiss, acoplado a um microcomputador com programa computacional Motic Images Plus 2.0 ML.

Para a análise morfométrica do intestino, 25 vilos intestinais por animal foram aferidos quanto à altura (Figura 1), totalizando 300 vilos por tratamento (Silva et al., 2010; Schamber, 2008) em programa computacional Motic Images Plus 2.0 ML.

Desafio bacteriano

A cepa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) utilizada no desafio bacteriano dos surubins foi fornecida pelo Laboratório de Camarões Marinhos, do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Para o preparo do material para o desafio, a bactéria *A. hydrophila* foi semeada em 50 ml de BHI (Brain Heart Infusion) e incubada por 24 horas em estufa bacteriológica à 30°C. Após, centrifugou-se a 400g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi resuspenso em solução salina

estéril (SSE 0,65%) para manter a concentração das bactérias. Foi utilizado 0,01 ml desta suspensão de bactérias para cada grama de peixe.

O desafio bacteriano foi realizado após a suplementação da dieta com o probiótico. Após este período, os surubins foram anestesiados em eugenol (50 mg.L⁻¹). Em seguida foi inoculada a bactéria *Aeromonas hydrophila*, na concentração de 2×10^8 UFC/ml (Silva et al., 2012) em 90 animais (18 peixes por tratamento), por meio de injeção na cavidade intracelomática.

A mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos da bacteriose foram observadas a cada doze horas até estabilizar a mortalidade.

Análises estatísticas

Para o parâmetro altura de vilo foi realizada a análise de regressão. Para os resultados de hematologia, desempenho produtivo, capacidade fagocítica e índice fagocítico, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com nível de significância 5 %. Quando as médias apresentaram diferenças significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Desempenho produtivo

Na variável de desempenho produtivo consumo de ração (CR), foi observado menor ($P < 0,05$) consumo entre os animais do grupo controle quando comparado com os peixes dos demais tratamentos. No entanto, não houve diferença no consumo de ração entre os quatro níveis de inclusão do probiótico (Tabela 3).

Não foi observada diferença ($P < 0,05$) para a taxa de eficiência proteica (TEP) nos tratamentos crescentes de probiótico (Tabela 5). Segundo Furuya *et al.*, (2005; 1996) dietas que disponibilizam altos valores de proteína bruta, resultam em piora na taxa de eficiência proteica. De acordo com Sonnenschein *et al.*, (1993), as enzimas de *Bacillus* são muito eficientes na quebra de carboidratos, lipídios e proteínas em unidades menores. Na alimentação de camarão, as bactérias probióticas podem facilitar a digestão de todas as proteínas constituintes da dieta, pois as enzimas produzidas pelas bactérias probióticas, podem complementar a atividade das proteases do camarão, aumentando a digestibilidade dos alimentos (Ochoa-Solano e Olmos-Soto, 2006).

Os valores de peso médio inicial (PI), peso médio final (PF), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA), ganho de biomassa (GB), taxa de eficiência proteica (TEP) e taxa de crescimento específico (TCE) não apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Farias (2012) avaliou o desempenho zootécnico de pacus após suplementação com diferentes dosagens dos probióticos *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, e também não verificou diferença estatística significativa no desempenho com diferentes níveis de inclusão do probiótico. A suplementação, portanto, não influenciou no ganho de peso, na conversão alimentar aparente e na taxa de crescimento específico.

Em estudo com tilápias-do-nilo suplementadas com probiótico *Bacillus subtilis* e prebiótico mananoligossacarídeo, Carvalho *et al.* (2011) não observaram diferença nos valores de biomassa final, ganho de peso médio,

ganho de peso diário, ganho em comprimento total e conversão alimentar aparente entre os diferentes níveis de inclusão de probiótico, prebiótico e grupo controle.

Mello (2012) realizou a suplementação com *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* em tilápias-do-nilo durante 80 dias e verificou que a conversão alimentar aparente e taxa de eficiência proteica não foram afetados pela suplementação.

Resultados positivos mostrando efeitos benéficos da inclusão de probióticos em dietas de peixes foram encontrados por outros autores. Estudo desenvolvido por Dias *et al.* (2012) avaliando a suplementação do probiótico *Bacillus subtilis* em juvenis de matrinxã durante 84 dias demonstraram uma melhora no desempenho produtivo (peso individual final, conversão alimentar aparente e taxa de crescimento específico) dos animais que receberam o probiótico em níveis de 5 e 10 g kg⁻¹ de ração.

Em estudo realizado com tilápias-do-nilo, verificou-se que os animais que receberam dieta com o probiótico Biogen® apresentaram maior ganho de peso e melhores taxas de crescimento específico e eficiência proteica quando comparado com o grupo controle (Haroun *et al.*, 2006). Aly *et al.*, (2008) avaliaram o efeito da suplementação de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus acidophilus* em dieta de tilápias-do-nilo, e observaram aumento da taxa de sobrevivência e ganho de peso desses animais.

A ausência de efeito do probiótico observada no presente estudo pode estar relacionada com o tempo de fornecimento do suplemento e as boas condições de manejo na qual os animais estavam submetidos, o que reduziu a

possibilidade de contato dos mesmos com microrganismos patogênicos, impedindo o probiótico de realizar exclusão competitiva, apresentando, portanto, pouca eficiência no desempenho produtivo (Loddi *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2003; Mello, 2012).

Parâmetros hematológicos

Avaliando-se estatisticamente os valores dos parâmetros hematológicos, observou-se que diminui o hematócrito e o número de eritrócitos na dose de 40 g aos 10 dias de suplementação com probiótico em relação ao grupo controle. Aos 20 dias de suplementação, houve diferença dos grupos suplementados com o grupo controle para a variável hemoglobina (Figura 3).

Para os valores de hematócrito aos 10 dias de suplementação, observou-se que o grupo controle apresentou valores maiores ($P < 0,05$) em relação ao tratamento com 40 g de probiótico. De acordo com Urbinati e Carneiro (2001), o aumento do hematócrito pode ser considerado um indicador de estresse. Com isto, o grupo de animais não alimentado com probiótico, pode ter sofrido um maior estresse que os animais alimentados com a maior dose de probiótico.

A alimentação por 10 dias com o probiótico influenciou o número de eritrócito, nos quais os animais tratados com 40 g de probiótico tiveram uma menor média em relação ao grupo controle. Estes dados são diferentes dos encontrados por Mouriño *et al.* (2011), em que surubins alimentados com probiótico e prebiótico, tiveram um aumento nos valores de eritrócitos.

Os valores de hemoglobina aos 20 dias de suplementação, para os animais alimentados com probiótico foram menores ($P<0,05$) que no grupo controle, independentemente da quantidade de probiótico fornecida. Entretanto os animais alimentados com probiótico, não houve diferença. Os resultados corroboram com El-Rhman et al. (2009), que avaliaram a suplementação alimentar com *Pseudomonas* sp. para tilápias durante 90 dias.

Na figura 4 estão relacionados os resultados de leucograma e trombograma. Observou-se que os valores de leucócitos na coleta basal, foram maiores nos animais suplementados com 30 gramas de probiótico e diferentes do grupo controle, 10 e 20 gramas de probiótico. Estes resultados diferem do estudo de Dias et al. (2012), que trabalharam com *Bacillus subtilis* para matrinxã. Nesse estudo não houve diferença nas variáveis de leucócitos, neutrófilos e monócitos circulantes.

Aos 10 dias de suplementação, para a variável linfócito, os animais suplementados com a dose de 30 gramas diferiu do grupo controle e dos animais suplementados com 20 gramas, nesta mesma variável o grupo controle apresentou o menor valor. Ainda para linfócito, na coleta basal, os valores diferiram da dose de 30 gramas para a dose de 10 e 20 gramas de probiótico. As células granulocíticas especiais, leucócito imaturo, monócitos e trombócitos não apresentaram diferenças significativas ($P<0,05$) entre os tratamentos nas diferentes coletas.

O maior número de eosinófilo na coleta final foi encontrado para a suplementação com 30 gramas, diferindo ($P<0,05$) do grupo controle, 10 e 20 gramas, e na dose de 10 gramas, essa célula não foi encontrado na contagem.

Segundo Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004), alguns granulócitos são encontrados com mais frequência em peixes portadores de parasitoses.

Observa-se que houve diferença estatística ($P < 0,05$) na coleta basal para basófilo, em que os animais do grupo suplementado com 40 gramas apresentaram médias superiores em relação ao grupo controle e da dose de 20 gramas. Para neutrófilo na coleta basal, a dose de 30 gramas apresentou a maior média e diferiu do controle e da dose de 20 gramas de probiótico. Já na coleta final, o maior valor encontrado para neutrófilo foi no grupo suplementado com 10 gramas de probiótico, sendo diferente ($P < 0,05$) dos grupos suplementados.

Capacidade Fagocítica

A inclusão crescente probiótico na alimentação de surubim proporcionaram aumento da capacidade fagocítica ($P < 0,01$) quando comparados ao grupo controle (Figura 5). Com isto, a inclusão de *Bacillus subtilis* por 20 dias nas dietas para juvenis de surubins, proporcionou maior capacidade de fagócitos em fagocitar as leveduras inoculadas. No estudo realizado por Farias (2012), também foi verificado aumento da capacidade fagocítica em pacus suplementados com a bactéria probiótica *Bacillus*.

No presente estudo não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos para o índice fagocítico (Figura 6). O mesmo resultado foi encontrado por Dias (2010), avaliando a suplementação de *Bacillus subtilis* para matrinxã, e por Nakandakare (2010) estudando a inclusão do probiótico

PAS TR (*Bacillus toyoi* $4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹ e *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹) para tilápia-do-nilo.

Itami et al. (1998) verificaram que a adição de *Bifidobacterium thermophilum* ao camarão Kuruma, melhorou significativamente o seu sistema imune, tendo uma maior sobrevivência quando desafiados com *V. penaeicida*. Os autores atribuíram a este fato o efeito imunoestimulador dos probióticos, visto que a atividade fagocítica de granulócitos de camarão, foi significativamente maior no camarão tratado em comparação com os animais do grupo controle.

Panigrahi et al. (2004) citam que animais alimentados com probiótico, tem uma porcentagem maior de células fagocíticas, prevenindo o animal contra microrganismos patogênicos. Esta proteção está relacionada com a imunomodulação do sistema de defesa dos animais, como a celular, e a capacidade de influenciar as respostas imunológicas tanto em níveis locais ou sistêmicas.

Histomorfometria intestinal

Na análise das vilosidades intestinais, a regressão indicou efeito linear negativo ($P < 0,01$) dos níveis de probiótico sobre a altura dos vilos intestinais. Foram estimados valores com a equação: $Y = 273,5062 - 0,3306 * X$, $R^2 = 0,2$. Os valores médios observados nos peixes suplementados com 10, 20, 30 e 40 g de probiótico foram 265,75; 278,22; 254,10 e 262,43 μm , respectivamente (Figura 2).

Pode-se observar uma redução nos valores médios para comprimento das vilosidades com o aumento dos níveis de inclusão do probiótico *B. subtilis*, o que sugere que a adição crescente não provocou o desenvolvimento da mucosa intestinal. Esses resultados não estão de acordo com Merrifield et al. (2010), que verificaram alterações benéficas das microvilosidades intestinais de salmonídeos, quando alimentados com ração suplementada com probiótico.

Foram observados resultados semelhantes em outros animais com o uso de suplementos alimentares. Ao trabalharem com coelhos Nova Zelândia Branco, Euler et al. (2010) concluíram que o aumento da inclusão de *Lithothamnium* sp, prejudicou o desenvolvimento da mucosa intestinal.

Silva et. al (2000), ao trabalharem com *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* não patogênica, verificaram que não ocorreu efeito significativo deste probiótico na altura das vilosidades do duodeno de aves durante 42 dias.

Segundo Furlan (2004), os efeitos benéficos do probiótico na morfometria intestinal está relacionada com a redução da colonização por bactérias prejudiciais à mucosa, que atuam inibindo sua aderência ao enterócito, por meio da ligação com o glicocálix. Esta ligação promove a exclusão competitiva de bactérias indesejáveis por meio da aderência aos sítios de ligação dos enterócitos (glicocálix), nos diferentes segmentos do intestino. No entanto, as condições experimentais não desafiaram o sistema imune intestinal dos animais, e isto é um pré-requisito básico para respostas com potencial de atuação na fisiologia digestiva, quando utilizados suplementos alimentares como o prebiótico e probiótico (Euler et al., 2010).

Desafio bacteriano

Após 120 horas de desafio com *Aeromonas hydrophila* foram observadas mortalidades em todos os grupos. Foi observada uma alta taxa de mortalidade no grupo que receberam a dose de 40 gramas de probiótico (38,9%), seguido dos grupos de 10 e 20 gramas, com taxa de mortalidade de 27,8%. O grupo controle apresentou uma mortalidade acumulada de 22,2%. Para o grupo com suplementação de 30 gramas, foi observada a menor mortalidade acumulada (16,7) 120 horas após o desafio, no entanto, não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos. A mortalidade iniciou 24 horas após inoculação com *Aeromonas hydrophila* e se estabilizou no quinto dia (Figura 7).

Após 12 horas do desafio, houve o surgimento de petéquias na base das nadadeiras anais, isolamento dos peixes e alteração do ânus com o aumento da irrigação sanguínea.

Carvalho (2010) realizou desafio com *Aeromonas hydrophila* em tilápias-do-nilo que receberam dieta suplementada com *Bacillus subtilis* e mananoligossacarídeo, e também não observou diferença estatística na sobrevivência quando comparado os diferentes níveis de inclusão de probiótico.

Estudo realizado por Mouriño (2010) com surubins híbridos submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila*, determinou alto índice de mortalidade após 24 horas da inoculação. No entanto, a mortalidade foi inferior nos animais tratados com *Weissella cibaria* e 0,5% de inulina, quando comparados aos animais do grupo não suplementado e suplementado com o *L. plantarum* e

0,5% de inulina. O quadro de mortalidade durante as 96 horas do experimento foi constante. O estudo evidenciou que o simbiótico pode melhorar a resposta de defesa em peixes no caso de infecção bacteriana.

Pacus alimentados com dietas sem adição de probiótico e submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila* apresentaram maior taxa de mortalidade quando comparados aos animais alimentados com dieta com diferentes níveis de inclusão dos probióticos *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, no estudo realizado por Farias (2012).

Camarões marinhos que receberam dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* e foram submetidos a desafio por *Vibrio harveyi* apresentaram maior sobrevivência após 10 horas de desafio quando comparados com o grupo que não recebeu suplementação (Vieira *et al.*, 2010).

Em conclusão, o fornecimento por 20 dias nas doses de 10, 20, 30 e 40 gramas do probiótico *Bacillus subtilis* por quilo de ração, não melhorou o desempenho produtivo, a histomorfometria intestinal e sobrevivência após desafio bacteriano em surubins *Pseudoplatystoma* spp. Houve alteração da hematologia e a melhora da capacidade fagocítica nos animais alimentados com o probiótico.

Referências

- Aly, S. M., Ahmed, Y. A., Ghareeb, A. A. & Mohamed, M. F. (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immun.*, 25, 128-136.
- Boleli, I.C., Maiorka, A. & Macari, M. (2002) *Estrutura funcional do trato digestório*. In: Macari, M. Furlan, R.L. & Gonzalés, E.P. (ed) *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*, Jaboticabal:FUNEP/UNESP, 75-96.
- Carvalho, J. V. (2010) *Mananoligossacarídeo e bacillus subtilis na alimentação de alevinos de tilápia do nilo (oreochromis niloticus)*. Mestrado. Universidade Federal da Bahia.
- Carvalho, J. V., Lira, A. D., Costa, D. S. P., Moreira, E. L. T., Pinto, L. F. B., Abreu, R. D. & Albinati, R. C. B. (2011) Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do -Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, 12 (1), 176-187.
- Dias, D. C., Furlaneto, F. P. B., Ayroza, L. M. S., Tachibana, L., Romagosa, E. & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2012) Probiotic in feeding of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*): economic viability. *Acta. Sci., Anim. Sci.*, 34 (3), 239-243.
- Dias, D.C. (2010) Probiótico no desempenho produtivo, hematologia e migração de macrófagos do matrinxã *Brycon amazonicus*. Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- El-rhman, A.M.A., Khattab, Y.A.E. & Shalaby, A.M.E. (2009) *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas species* as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immun.*, 27, 175-180.
- Euler, A.C.C., Ferreira, W.M., Teixeira, E. A., Lana, Â.M.Q., Guedes, R.M.C. & Avelar, A.C. (2010) Desempenho, digestibilidade e morfometria da vilosidade ileal de coelhos alimentados com níveis de inclusão de "*Lithothamnium*". *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, 11 (1), 91-103.
- Farias, T. H. V. (2012) *Probiótico na alimentação do pacu (Piaractus mesopotamicus): avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e desempenho produtivo*. Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Furlan, R.L., Macari, M. & Luquetti, B.C. (2004) Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: 5º *Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição*. Balneário Camboriú.

- Furuya, W.M., Botaro, D., Macedo, R.M.G., Santos, V.G., Silva, L.C.R., Silva, T.C., Furuya, V.R.B. & Sales, P.J.P. (2005) Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 34 (5), 1433-1441.
- Furuya, W.M., Hayashi, C., Furuya, V.R.B. & Soares, C.M. (2000) Exigência de proteína para alevino revertido de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, 26 (6), 1912-1917.
- Furuya, W.M.; Hayashi, C.; Furuya, V.R.B. (1996.). Exigência de proteína para machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na fase juvenil. *Revista Unimar*, v.18, n.2, p.307-319.
- Garcia, F. (2005) *Pacus Piaractus mesopotamicus alimentados com dietas suplementadas com vitamina C e E e submetidos ao desafio por Aeromonas hydrophila*. Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Gatesoupe, F.J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, E.A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E. & Cutting, S.M. (1999) Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4288-4291.
- Haroum, E. R., Goda, A. M. & Chowdhmy, M. A. K. (2006) Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Res.*, 37, 1473-1480.
- Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 813–835.
- Hrube, T.C.; Smith, S.A. (1998) *Hematology of fish*. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5^a ed., p.1120-1125.
- Itami, T. Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Noboru, T., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164, 277–288.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R. & Kayak, S.K. (2008) Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immun.*, 24, 168-172.
- Lima, A.C.F., Pizauro, J.R., Macari, M. & Malheiros, E.B. (2003) Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *R. Bras. Zootec.*, 32 (1), 200-207.

Loddi, M.M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. *Rev. Cons. Fed. Med. Vet.*, (23), 1-8, 2001.

Maiorka, A.; Boleli, IC. & Macari, M. (2002) *Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal*. In: Macari, M., Furlan, R.L., Gonzales, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 143-148.

Mello, H. (2012) *Bacillus cereus e Bacillus subtilis na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (Oreochromis niloticus) e seu efeito probiótico*. Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

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

Mouriño, J. L. P. (2010) *Suplementação dietética com simbiótico para o híbrido de pintado (pseudoplatystoma corruscans) e cachara (p. fasciatum)*. Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A. B., Silva, B.C., Jesus, G.F.A, Seiffert, W.Q. & Martins, M. L. (2011) Effect of dietary supplementation of inulin and *W.cibaria* on haemato-immunological parameters on hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* spp.), *Aquaculture Nutrition*, 17, 1-8.

Nakandakare, I. B. 2010. Inclusão de probióticos durante o processamento de ração para tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, variação Gift. *Dissertação* (Mestrado em Aquicultura e Pesca). Instituto de Pesca, São Paulo. 74p.

Ochoa-Solano, J.L. & Olmos-Soto, J. (2006) The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519–525.

Olmos, S.J. (2003). Molecular characterization and phylogenetic identification of marine microorganisms. In: *X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.

Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh S. & Sugita H. (2004) Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 379-388.

Petri, R. (2000) Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil. II Simpósio de sanidade avícola, setembro de 2000. Santa Maria-RS.

Raida, M.K., Larsen, J.L., Nilsen, M.E. & Buchmann, K. (2003) Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BIOPLUS2B). *J. Fish Dis.*, 26, 495–498.

Schamber, C.R. (2008) *Exigência de fósforo para a tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) na terminação*. Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q. & Martins, M.L. (2012). Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*, *Aquacul. Res.*, 43, 908-916.

Silva, E.F., Soares, M.A., Calazans, N.F., Vogeley, J.L., Do Valle, B.C., Soares, R. & Peixoto, S. (2013) Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacul. Res.*, 44, 13-21.

Silva, E.N.; Teixeira, A.S.; Fialho, E.T.; Bertechini, A.G.; Souza, P.R.I (2000) Efeitos dos probióticos e antibióticos sobre as vilosidades e pH do trato gastrointestinal de Frangos de corte. *Ciência Agrotécnica*, v.24, p.163-173. Edição especial.

Silva, L.C.R., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Schamber, C.R., SANTOS, L.D. & Vidal, L.V.O. (2010) Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *R. Bras. Zootec.*, 39 (6), 1175-1179.

Sonnenschein, A.L., Losick, R. & Hoch, J.A. (1993) *Bacillus subtilis and Others Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington: American Society for Microbiology.

Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. & Deguchi, Y. (1998) Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*, 165, 269–280.

Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. (2003) Características hematológicas da Tilapia *rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Biosci. J.*, 19 (1), 107-114.

Tournut, J.R. Probiotics. (1998) In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. Anais... Botucatu: SBZ, 179-99.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 655-671.

Vieira, F.N., Buglione, C.C., Mouriño, J.P.L., Jatobá, A., Martins, M.L., Schleder, D.D., Andreatta, E.R., Barraco, M.A. & Vinatea, L.A. (2010) Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62 (3), 631-638.

Tabela 5. Valores médios ($\pm$ desvio padrão da média) do peso inicial (PI), do peso final (PF), do ganho de peso (GP), da conversão alimentar aparente (CAA), do consumo de ração (CR), ganho de biomassa (GB), taxa de eficiência proteica (TEP) e da taxa de crescimento específico (TCE) de juvenis de surubins alimentados probióticos *B. subtilis* durante 20 dias.

Tratamentos	PI (g)	PF (g)	GP (g)	CAA	CR (g)	GB (g)	TEP (G)	TCE (cm)
Controle	24,55 $\pm$ 1,10	26,88 $\pm$ 1,29	2,33 $\pm$ 1,24	4,48 $\pm$ 2,43	8,05 ^b $\pm$ 0,15	20,93 $\pm$ 11,14	5,82 $\pm$ 3,03	0,45 $\pm$ 0,23
10 g	24,78 $\pm$ 1,14	28,31 $\pm$ 2,04	3,53 $\pm$ 1,19	3,07 $\pm$ 1,21	9,68 ^a $\pm$ 0,16	31,76 $\pm$ 10,72	7,39 $\pm$ 2,52	0,66 $\pm$ 0,20
20 g	24,15 $\pm$ 0,55	27,75 $\pm$ 1,21	3,60 $\pm$ 0,94	2,98 $\pm$ 0,93	10,00 ^a $\pm$ 0,15	32,40 $\pm$ 8,48	7,28 $\pm$ 1,88	0,69 $\pm$ 0,17
30 g	24,52 $\pm$ 0,81	28,98 $\pm$ 0,95	4,46 $\pm$ 1,49	2,56 $\pm$ 1,17	10,07 ^a $\pm$ 0,81	40,16 $\pm$ 13,41	8,99 $\pm$ 3,12	0,84 $\pm$ 0,28
40 g	24,35 $\pm$ 0,98	28,50 $\pm$ 2,14	4,15 $\pm$ 1,42	2,84 $\pm$ 1,69	9,85 ^a $\pm$ 0,24	37,35 $\pm$ 12,82	8,55 $\pm$ 3,01	0,78 $\pm$ 0,25

Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste Tukey (P<0,05)

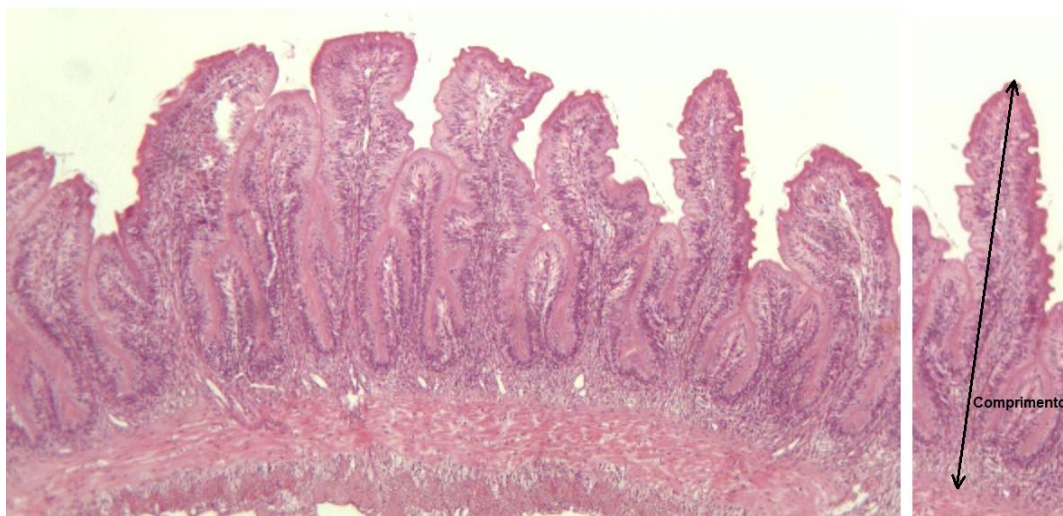


Figura 1. Fotomicrografia da mucosa intestinal do surubim *Pseudoplatystoma* spp. Nela pode ser observada a altura de vilosidade. Coloração: H. E. 100x

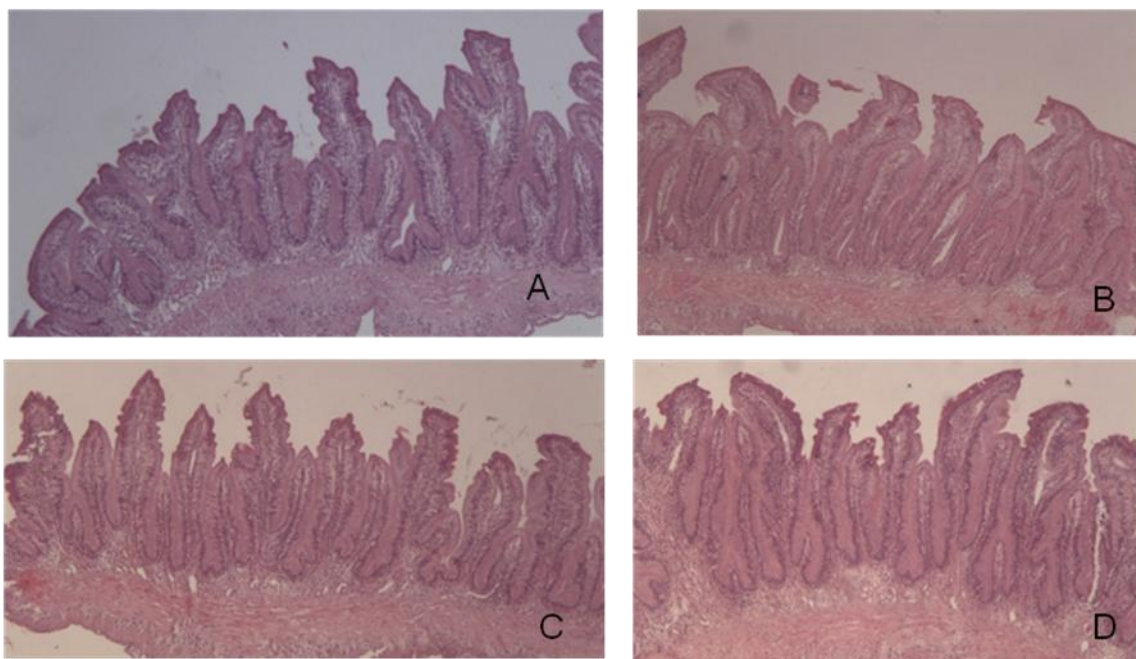


Figura 2. Fotomicrografia da mucosa intestinal dos surubins *Pseudoplatystoma* spp. alimentados com dietas contendo 10 g (A), 20 g (B), 30 g (C) e 40 g (D) de probiótico *Bacillus subtilis* por quilo de ração. Coloração: H. E. 100x

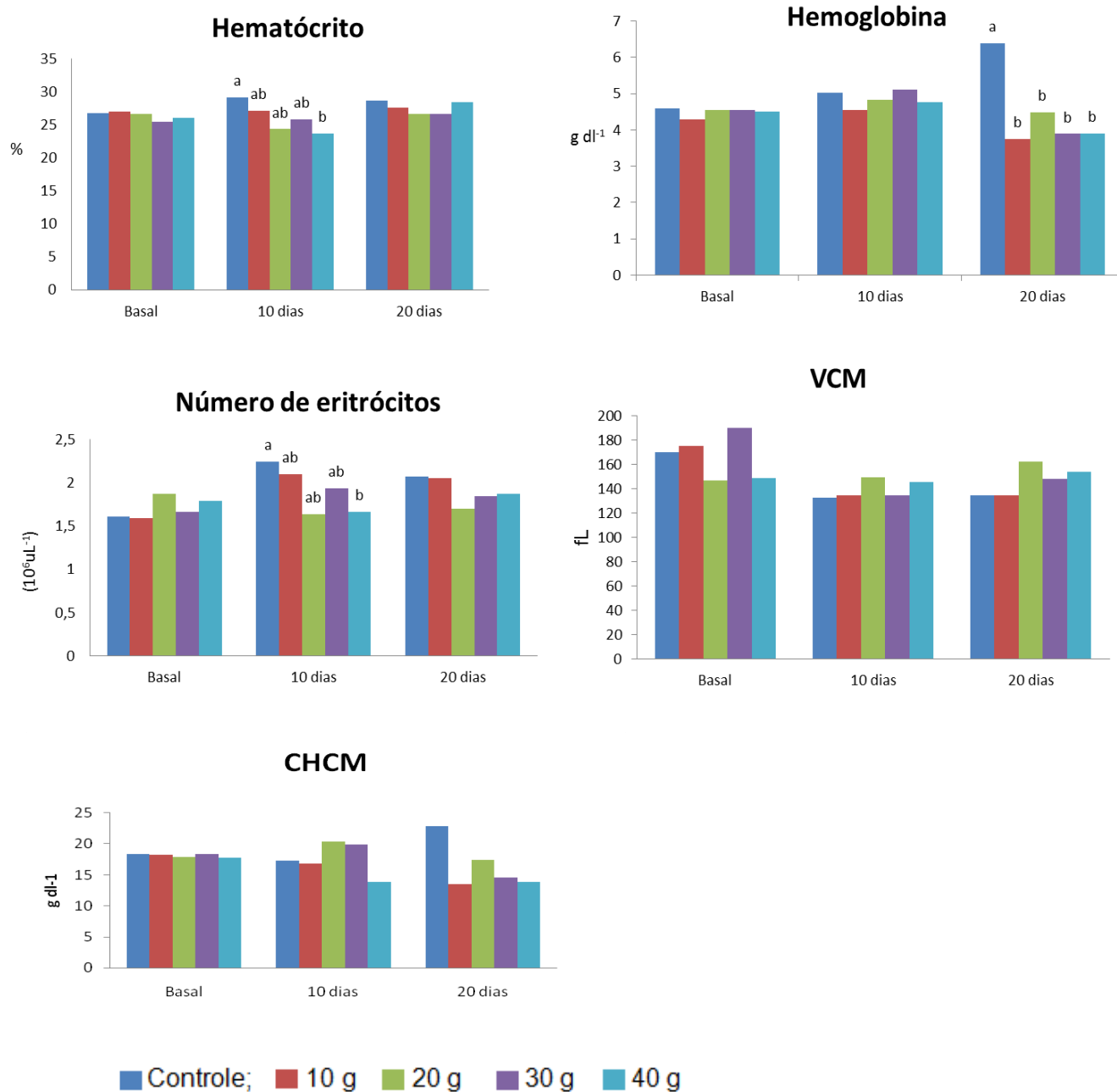


Figura 3. Valores de eritrograma de juvenis de surubins *Pseudoplatystoma* spp. alimentados ou não com probiótico *Bacillus subtilis*. Letras diferentes na mesma coleta indicam diferença pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

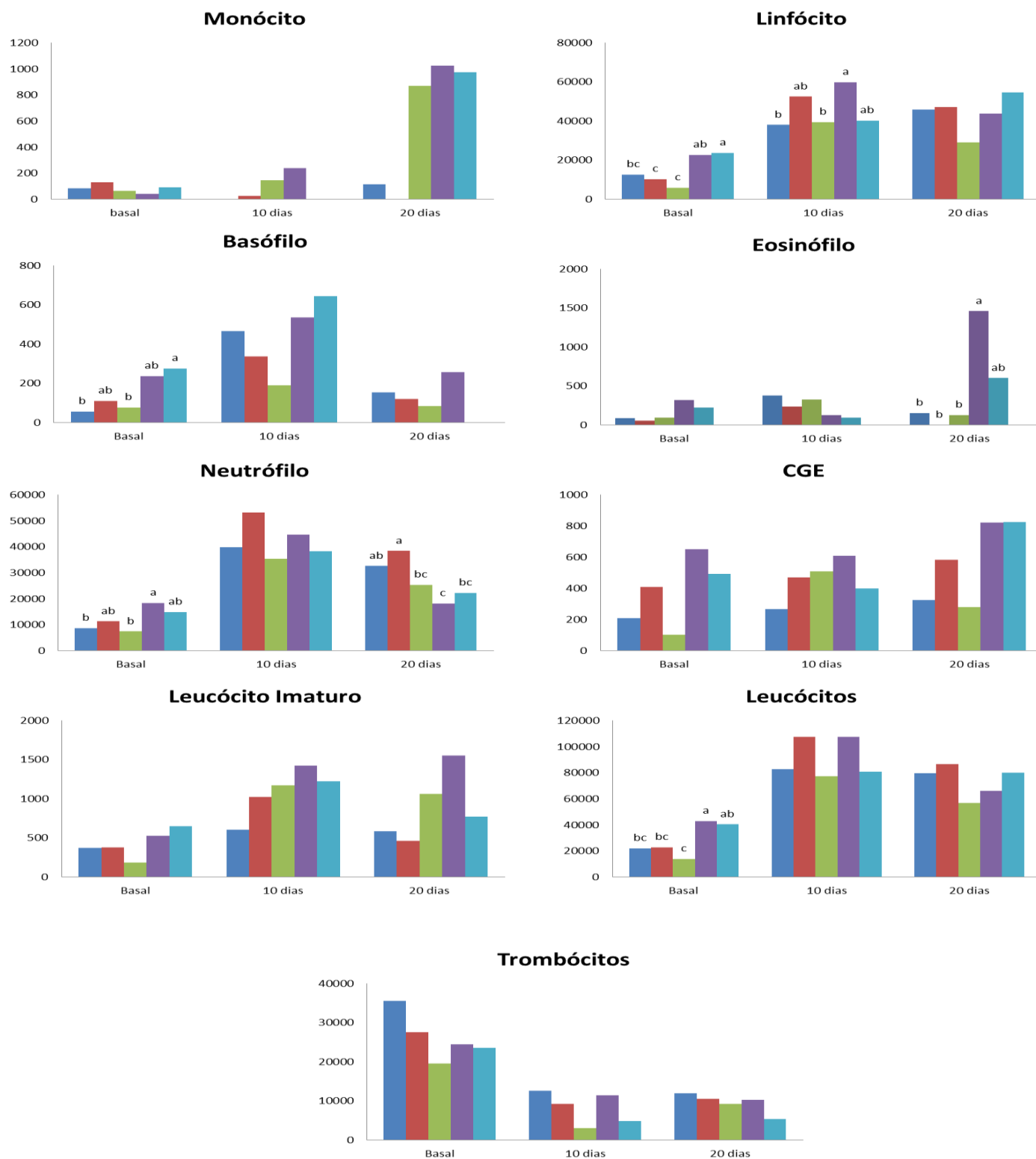


Figura 4. Valores de trombograma (μL^{-1}) e leucograma (μL^{-1}) de juvenis de surubins *Pseudoplatystoma* spp. alimentados ou não com probiótico *Bacillus subtilis*. Letras diferentes na mesma coleta indicam diferença pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

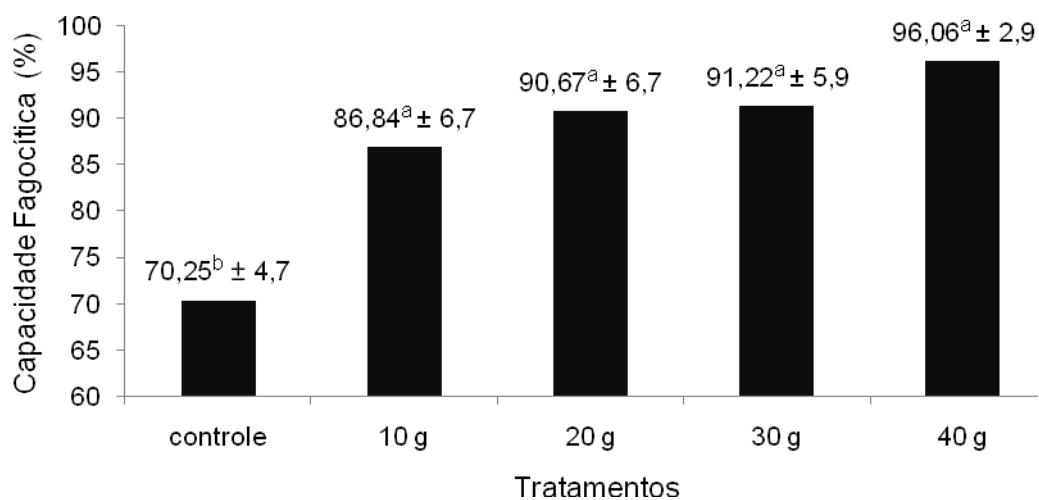


Figura 5. Valores médios percentuais da capacidade fagocítica de surubim *Pseudoplatystoma* spp. suplementados ou não com probiótico. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

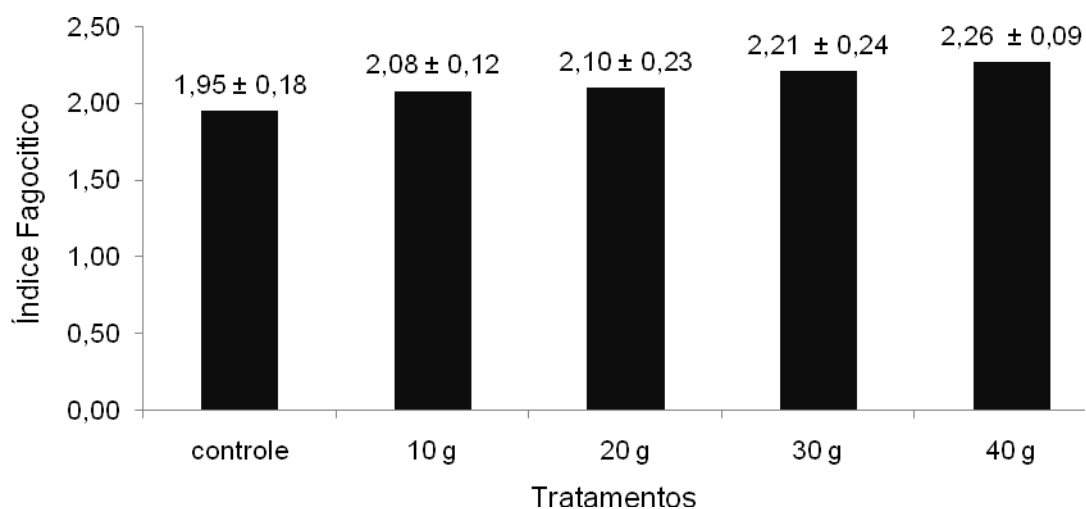


Figura 6. Valores médios dos índices fagocíticos de surubim *Pseudoplatystoma* spp. suplementados ou não com probiótico. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

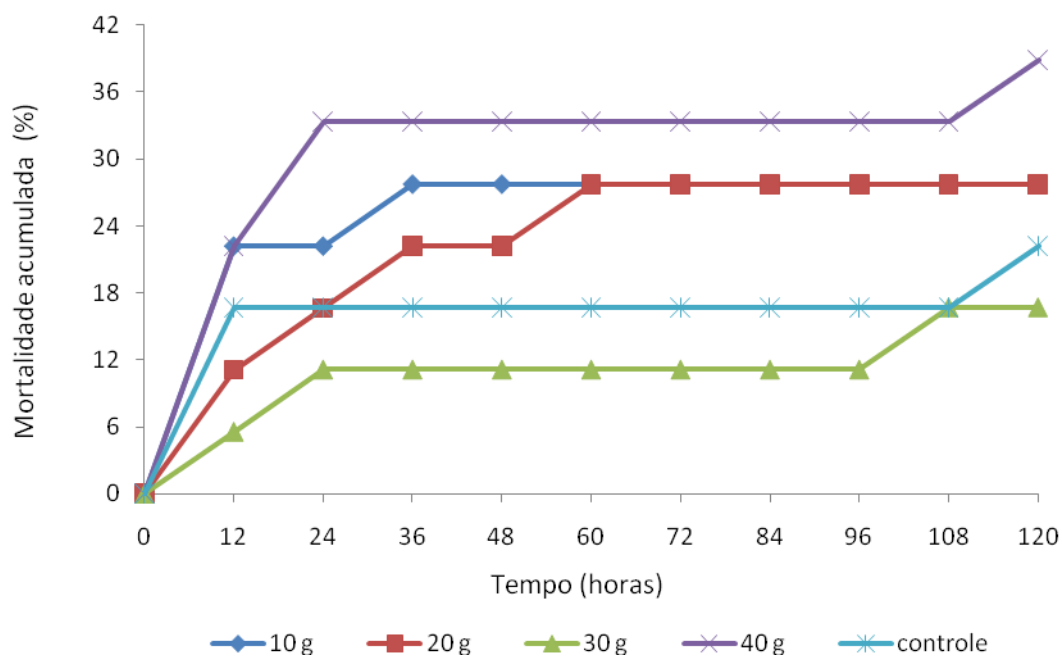


Figura 7. Mortalidade acumulada de surubins *Pseudoplatystoma* spp. suplementados com probiótico, após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da bactéria probiótica *Bacillus subtilis* para surubins em nível experimental, não influenciou no desempenho produtivo deste peixe. Suplementos alimentares têm os efeitos potencializados quando ocorre um desequilíbrio no meio de produção, ou nas dietas fornecidas. Resultados ligados ao desempenho produtivo necessitam de um período maior de alimentação com suplementos, desta forma os animais podem passar por situações adversas. A realização desta pesquisa em laboratório, não permite que os animais passem por situações reais de produção, como quedas de oxigênio, mudanças de temperatura e altas densidades de estocagens.

O fornecimento de probiótico em curtos períodos são mais promissores nos resultados ligados ao sistema imune, como verificado nesta pesquisa. Foi verificado também que o desafio bacteriano por inoculação, ultrapassa as barreiras iniciais de defesa do animal, sugerindo a infecção por coabitação, que é um método de infecção mais natural.

É válido sempre levar em consideração, a viabilidade da suplementação em escala industrial, com a utilização de bactérias probióticas de fácil incorporação e de grande resistência.