

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA PROBIÓTICA COMO MANEJO
SANITÁRIO AMBIENTALMENTE CORRETO NA CRIAÇÃO DE
PEIXE MARINHO.**

PETERSON EMMANUEL GUIMARÃES PAIXÃO

Aracaju
Janeiro, 2018

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA PROBIÓTICA COMO MANEJO
SANITÁRIO AMBIENTALMENTE CORRETO NA CRIAÇÃO DE
PEIXE MARINHO**

Dissertação de Mestrado submetido à banca examinadora para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de enfermidades e agravo à saúde de impacto regional.

PETERSON EMMANUEL GUIMARÃES PAIXÃO

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto

Aracaju

Janeiro, 2018

P142s Paixão, Peterson Emmanoel Guimarães
Suplementos dietético probiótico como manejo sanitário ambientalmente
correto na criação de peixe marinho / Peterson Emmanoel Guimarães Paixão;
orientação [de] Prof. Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto – Aracaju: UNIT, 2018.

63 f. il ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2018
Inclui bibliografia.

1. Peixe ornamental. 2. Peixe palhaço. 3. Probiótico I. Paixão, Peterson Emmanoel
Guimarães. II. Fujimoto, Rodrigo Yudi. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV.
Título.

CDU: 639. 34. 043. 13

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA PROBIÓTICA COMO MANEJO SANITÁRIO AMBIENTALMENTE CORRETO NA CRIAÇÃO DE PEIXE MARINHO

Peterson Emmanuel Guimarães Paixão

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA A BANCA EXAMINADORA PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA AREA DE
ENFERMIDADES EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovado por:

Rodrigo Yudi Fujimoto
Orientador

Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo
Universidade Tiradentes

Carolina Nunes Costa Bomfim
Universidade Federal de Sergipe

Cristiane Costa da Cunha Oliveira
Universidade Tiradentes (Suplente)

Aracaju
Janeiro, 2018

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo...

Agradeço a minha família por todo apoio e conselhos ao longo da vida. Dedico este trabalho ao meu pai Manoel Messias da Paixão, Maria Auxiliadora Guimarães Paixão e Jefferson Emmanuel Guimarães Paixão. Agradeço ao meu orientador Rodrigo Yudi Fujimoto por todo ensinamento e a todas as pessoas que estiveram comigo nesta jornada de conhecimento.

Agradeço a Deus por tudo...

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Objetivo	9

CAPÍTULO 1

Aquicultura ornamental marinha	11
Peixe palhaço	11
Vibriose	12
Probiótico	13
Risco a Saúde Pública	14

CAPITULO 2

Metodologia	26
-------------------	----

CAPITULO 3

SELEÇÃO IN VITRO DE BACTERIA AUTOCTONE COM POTENCIAL PROBIOTICO NO CULTIVO DE PEIXE PALHAÇO

Resumo	34
Abstract	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultado	39
Discussão	41
Conclusão	43
Referencias	43

CAPITULO 4

SUPLEMENTAÇÃO PROBIÓTICA AUTÓCTONE COM LACTOBACILLUS PLANTARUM DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E SOBREVIVÊNCIA DO PEIXE PALHAÇO AMPHIPRION OCELLARIS EM CATIVEIRO

Resumo	45
Abstract	46
Introdução	47
Material e Métodos	49
Resultado	49
Discussão	55
Referencias	57

Resumo

O peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* é uma espécie ornamental marinha com alto valor de mercado. A intensificação de seu cultivo em cativeiro promoveu o aumento de enfermidades devido a fatores estressantes por manejo inadequado. Infecções bacterianas estão entre as doenças mais comuns para peixes ornamentais. Para controlar estas infecções, muitos produtores utilizam de maneira errada antibióticos colocando em risco tanto o meio ambiente quanto a saúde pública. Por este motivo existe uma necessidade de medidas mais ecologicamente corretas tal como o uso de probióticos. Probióticos são microorganismos vivos suplementados a dieta que promovem benefícios ao seu hospedeiro tanto fisiológico quanto imunológico. Assim, objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de bactéria autóctone com potencial probiótico no cultivo do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*. Inicialmente as bactérias com potencial probiótico foram isoladas do trato intestinal de 6 peixes palhaço e posteriormente submetidas a testes in vitro como produção de catalase, resistência à pH, bile e NaCl, e inibição de patógeno. Para o estudo in vivo foram utilizados 120 animais com peso médio $460 \pm 0,10$ mg distribuídos em aquários de vidro com capacidade total para 80 litros interligados a um sistema de recirculação de água. Estes animais foram aclimatados e alocados em densidade de 10 peixes/aquário. Um delineamento inteiramente casualizado foi conduzido com quatro tratamentos (Controle, 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/g) e três repetições. Em uma ração comercial específica para ornamental marinho foi adicionado o probiótico, e os peixes alimentados a uma taxa de alimentação de 4% do peso vivo na frequência de três vezes ao dia. O experimento teve duração de 90 dias realizando biometrias mensais para a determinação dos parâmetros de desempenho zootécnico. Para a biometria final, nove peixes de cada tratamento foram amostrados para a análise hematológica. Posteriormente os mesmos foram submetidos a eutanásia para coleta de órgãos para análises microbiológicas e histológicas. Ao término do experimento in vivo foi realizado um desafio com uma bactéria patogênica. Esse experimento constituiu-se de dos quatro tratamentos anteriores (sem suplementação, suplementados com 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/g) com injeção de *Vibrio fluvialis* 1×10^5 UFC/mL, e um controle com injeção de solução salina estéril (NaCl 1,5%) nos peixes sem suplementação. Durante 96 horas, os animais foram avaliados quanto a sinais clínicos e sobrevivência, a cada duas horas. Ao final de 96 horas os animais sobreviventes foram anestesiados e submetidos a análises hematológicas e microbiológica como descrito anteriormente. Para os resultados in vitro, foram selecionadas cinco (5) bactérias ácido láctica gram-positiva e catalase negativa com morfologia de cocos e bacilo cocos (CP01; CP02; CP03; CP04 e CP05). Ao final dos experimentos a CP05 mostrou melhor resultado para os testes de resistência e antagonismos frente a patógeno, sendo identificada como *Lactobacillus plantarum*. Para os resultados in vivo sua suplementação na dieta promoveu melhor desempenho zootécnico nas concentrações de 10^6 e 10^8 UFC/g ao final de 90 dias, bem como aumento de células fagocitárias no sangue como trombócito, monócito e neutrófilo. Para o experimento de desafio por bactéria patogênica, foi observada maior sobrevivência e resistência a infecção no tratamento 10^8 UFC/g. Conclui-se que a suplementação probiótica na concentração 10^6 UFC/g é suficiente para promover uma melhora zootécnica, e na concentração 10^8 UFC/g uma melhora imunológica dos peixes palhaço.

Palavra-chave: Ornamental marinho, peixe palhaço, probiótico.

Abstract

Marine ornamental fish farming is one of the aquaculture sector with great potential for economic and social development due to its low production costs and high economic returns. Among the species most produced, the clownfish *Amphiprion ocellaris* stands out for its high market value and ease cultivation, but also as a tool for ecological awareness and environmental protection in order to reduce predatory fishing. However, along the intensification of the production, stress factors such as high stocking densities and inadequate handling promoted the increase of diseases. Bacterial infection is the most common disease for ornamental fish, responsible for high mortality rate. To control these infections, many producers misuse antibiotics, putting in risk both the environment and public health. For this reason, is required more ecologically correct measures such as the use of probiotic. The probiotic is defined as the use of live microorganisms supplemented to the diet that promote benefits to its host both physiologically and immunologically. Thus, the objective of the present study was to evaluate the use of autochthonous bacteria with probiotic potential in the culture of clownfish *Amphiprion ocellaris*. Initially bacteria with probiotic potential were isolated from the intestinal tract from 6 clown fish and later submitted to in vitro tests such as catalase production, resistance to pH, bile and NaCl, and inhibition of pathogen test. For the in vivo assay, 120 animals with a mean weight of $0.46 \pm 0.01\text{g}$ were distributed in glass aquariums (80 liters) interconnected to a water recirculation system. These animals were acclimated and allocated in density of 10 fish / aquarium. A completely randomized design was conducted with four treatments (Control, 10^4 , 10^6 , $10^8\text{UFC} / \text{g}$) and three replicates. The bacteria was added into a specific marine ornamental ration, and the fish fed at feeding rate of 4% of live weight, distributed three times a day. The experiment period was 90 days with monthly biometrics to determine the zootechnical performance. In the last biometry, three fish from each treatment were sampled to hematological analysis. Subsequently, they were euthanatized for collection of organs for microbiological and histological analyzes. After the in vivo experiment, a bacterial challenge was performed. A concentration of $1 \times 10^5\text{UFC/mL}$ of *Vibrio fluvialis* was injected in each treatment from previous experiment (fish no supplemented, 10^4 , 10^6 , 10^8UFC/g) with plus and a control was injected with sterile saline solution injection (1.5%). Clinical signs and survival were assessed every two hours for 96 hours. The survival animals were anesthetized and euthanatized to hematological, microbiological and histological analyzes. For the "in vitro" results, five (5) gram-positive and catalase-negative lactic acid bacterium with coccus and bacillus morphology were selected (CP01; CP02; CP03; CP04 and CP05). In the end, CP05 showed largest growth over resistance tests and inhibition of pathogen, being identified as *Lactobacillus plantarum*. Its supplementation in the diet promoted better zootechnical performance at concentrations of 10^6 and 10^8UFC/g as well as increase of phagocytic cells like thrombocyte, monocyte and neutrophil. Higher survival was also observed for animals supplemented with probiotic 10^8UFC/g after bacterial challenge. It is concluded that probiotic supplementation in the concentration 10^6UFC/g promotes zootechnical improvement and with 10^8UFC/g promote better survival for clownfish in captivity

Keywords: Ornamental marine, Clownfish, Probiotic.

Introdução

A piscicultura ornamental marinha é um dos ramos da aquicultura com grande potencial de desenvolvimento econômico e social devido ao seu baixo custo de produção e alto retorno econômico. (KODAMA *et al.*, 2011; FAO, 2018). Diversas espécies são comercializadas como ornamental, entretanto os peixes de recife de coral são os principais negociados devido ao seu alto valor de mercado (FOTEDAR & PHILLIPS, 2011). Neste cenário, destaca-se o peixe palhaço por suas diferentes formas padrões e cores atraentes (WABNITZ *et al.*, 2003).

Em 2002, devido a sua eminente popularidade cinematográfica através de um longa-metragem, a sua demanda no mercado cresceu expressivamente. Com isso, os recifes de coral já não suportavam mais a pesca predatória dessa espécie. Então, impulsionado pela demanda do mercado e pressão governamental para proteger os habitats de recife de coral, a produção de cativeiro do peixe palhaço aumentou (RHYNE *et al.*, 2012; MILITZ & FOALE, 2017).

Atualmente, o peixe palhaço é uma das espécies mais importadas e exportadas como ornamental marinho, sendo produzida em cativeiro por 10 países (FAO, 2010; RHYNE *et al.*, 2017). Contudo, esse aumento de produção promoveu o aumento de enfermidades, atribuído a fatores estressantes como alta densidade de estocagem, manejos inadequados e má qualidade de água (PAVANELLI *et al.*, 2009). Para peixes marinhos, um dos principais patógenos que promovem surtos de mortalidade são as infecções por vibrios (FIORAVANTE & FLORIO, 2017).

Algumas vibrioses já foram descritas na literatura por infectar peixes ornamentais como o *Vibrio alginolyticus* em *Amphiprion sabaes* e *Vibrio fluvialis* em *Pomacentrus caeruleus* (SONIA & LIPTON, 2012; DHAYANITHI *et al.*, 2010). Para o controle desses patógenos, os piscicultores usam erroneamente quimioterápicos que colocam em risco a saúde pública. Dentre estes quimioterápicos, destaca-se alguns antibióticos como eritromicina, estreptomicina e oxytetraciclina, amplamente usados na área da aquicultura (NEOWAJH *et al.*, 2015).

Mesmo para antibióticos foto degradáveis como a oxytetraciclina, seus compostos não são completamente metabolizados deixando resíduos no meio ambiente. Inevitavelmente, estes resíduos podem promover a seleção de bactérias mais resistentes. Diversas dessas bactérias que acometem peixes ornamentais apresentam potencial zoonótico tornando-se um grande problema de saúde pública e ambiental (REYES *et al.*, 2006; GASTALHO *et al.*, 2014; GAUTHIER, 2015). Contudo, para contornar esse problema o uso de probiótico vem se tornando cada vez mais comum na aquicultura (PARK *et al.*, 2017; JATOBA *et al.*, 2018).

Probiótico é definido como qualquer microorganismo vivo suplementado à dieta do animal promovendo benefícios a saúde do hospedeiro e atuando na inibição de patógenos de forma direta e indireta (SAYES *et al.*, 2018). Diversos exemplos são reportados na literatura com esse aumento de resistência a patógenos. De acordo com Dias *et al.* (2018) tambaquis *Colossoma macropomum* alimentados por dieta suplementado com probiótico autóctone apresentaram maior resistência a infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*.

O uso de probiótico autóctone (bactérias isoladas da própria espécie) suplementado a dieta do animal, promove inúmeros benefícios a sua saúde e uma maior resistência a infecções quando comparado a probióticos alóctone (bactéria isolada de outra espécie). Com estes benefícios fornecidos por uma dieta probiótica autóctone, a estratégia vem sendo cada vez mais usada na aquicultura marinha. Contudo, ainda existem diversas espécies ornamentais de importância comercial como o peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* que não foram estudadas. Assim, torna-se necessário completar o pacote tecnológico dessas espécies (Alimentação adequada e ecologicamente correta) que ainda não possuem informações científicas.

Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar o efeito de uma bactéria autóctone com potencial probiótico na criação em cativeiro de peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*.

Objetivos específicos

- Isolar e selecionar in vitro bactérias com potencial probiótico.
- Avaliar o desempenho zootécnico e sanitário do peixe palhaço através da suplementação probiótica na dieta.
- Avaliar a colonização da bactéria probiótica no trato intestinal dos peixes.
- Avaliar os parâmetros hematológicos dos peixes submetidos à suplementação probiótica de 90 dias
- Avaliar a resistência e sobrevivência dos animais desafiados por bactéria patogênica marinha *Vibrio fluvialis*.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

Aquicultura ornamental marinha

Os peixes ornamentais marinhos ocupam um lugar de destaque no comércio mundial devido ao seu alto valor mercado. Em 1993 a indústria ornamental marinha movimentou aproximadamente 100 milhões de dólares. Entre as espécies ornamentais marinhas mais comercializadas ao redor do mundo, os peixes de recife de coral são os principais negociados (CHAPMAN *et al.*, 1997; WABNITZ *et al.*, 2003). Ao final da década de 90 quase 800 espécies passaram a ser comercializadas (VERON, 2000).

Devido a este alto valor econômico atribuído a estes peixes, nos anos 2000 foi estimado que 1kg de peixes ornamentais marinho era vendido a US\$ 500 dólares, enquanto 1kg de peixe para consumo alimentar custava US\$ 6 dólares (CATO, 2003; FOTEDAR & PHILLIPS, 2011). Com o passar dos anos, a indústria ornamental marinha passou ampliar o número de países envolvidos na atividade, movimentando em 2011 aproximadamente 1,5 bilhões de dólares. Atualmente mais de 40 países, incluindo o Brasil, participam desta atividade bilionária (RHYNE *et al.*, 2012; COHEN *et al.*, 2013; RHYNE *et al.*, 2017; LADISA *et al.*, 2017).

Dentre as diversas espécies de recife de coral sendo comercializadas como peixe ornamental marinho, o gênero *Amphiprion sp.* em 2008 tornou-se o carro chefe do mercado mundial. Entre as 10 principais espécies mais importadas e exportadas pelo planeta, 7 fazem parte deste gênero. O peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* é um exemplo, sendo um dos 3 primeiros do ranking de negociações entre aquaristas e produtores (FAO, 2010; RHYNE *et al.*, 2017).

Peixe palhaço

A espécie *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830) conhecida como peixe palhaço ou peixe anêmona, possui cores vibrantes em tons de vermelho preto e branco, com variados padrões e formas (Figura 1). São amplamente distribuídos por todo oceano Índico e pacífico, habitando recifes de coral, vivendo em simbiose com anêmonas podendo atingir até 10 cm de comprimento (MOYER & NAKAZONO, 1978; MASUDA *et al.*, 1984; ALAVA & GOMES, 1989; MOHSIN *et al.*, 1993).



Figura 1. Juvenil de peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*

A relação com anêmonas do mar é uma de suas peculiares características, mostrando-se uma excelente estratégia de sobrevivência. O peixe palhaço alimenta-se de pequenos invertebrados que oferecem riscos para a anêmona, assim como fornece nutrientes para a mesma devido aos restos de alimento e material fecal. Os peixes palhaços, entretanto recebem proteção contra predadores devido as células urticantes presentes na anêmona, as quais não os afetam (DOKTOR & BUI, 2018).

Sua hierarquia social é determinada pelo tamanho e agressividade, definindo através destes fatores a sexualidade de cada indivíduo. Em grupos de 4 ou 5 palhaços de uma anêmona, o mais agressivo e com maior tamanho torna-se a fêmea apta para reprodução, enquanto o segundo maior acaba se tornando macho reprodutor. Os demais peixes do grupo permanecem como machos imaturos. São altamente prolíferos, com desova parcelada, colocando de 400 a 700 ovos dependendo do tamanho da fêmea (BOSTON, 2003; IWATA *et al.*, 2008; DHANEESH *et al.*, 2009).

São peixes que apresentam cuidado parental, permanecendo na área de desova durante todo tempo de incubação (7 a 8 dias). O macho tem como função principal “abandar” os ovos aderidos ao substrato com suas nadadeiras e remover os não viáveis com o passar dos dias. A fêmea por sua vez cuida da proteção do local devido ao seu maior tamanho e agressividade. Após a eclosão, devido ao pequeno tamanho, as larvas alimentam-se inicialmente de rotíferos e posteriormente de pequenos crustáceos como artemia recém eclodida (WITTENRICH, 2007).

Quando sofrem alteração em seu grupo por uma eventual morte da fêmea, o macho reprodutor pode mudar de sexo e tornar-se a nova fêmea apta para reprodução. Essa estratégia reprodutiva classifica esses peixes como hermafroditas protândricos (HOFF, 1996). Todas estas características visuais, comportamentais e reprodutivas tornam o peixe palhaço um perfeito candidato ao cultivo de cativeiro como espécie ornamental (ZUANON *et al.*, 2011). De acordo com Kodama *et al.* (2011) a produção de cativeiro da espécie *Amphiprion ocellaris* é uma atividade economicamente viável e altamente rentável devido ao seu valor de mercado.

Ao final da década de 90, aproximadamente 15% da exportação mundial de peixe ornamental marinho foi representada pelo peixe palhaço. Quando observado apenas no continente europeu, o valor foi de 25% (WABNITZ *et al.*, 2013). Contudo, após a produção e lançamento do filme *Procurando Nemo* em 2002 a popularidade da espécie aumentou consideravelmente, potencializando seu comércio e produção de cativeiro (MILITZ & FOALE, 2017). Em poucos anos, o percentual de exportação de peixe palhaço ao redor do mundo dobrou (30%) (RHYNE *et al.*, 2017).

Dentre as espécies ornamentais marinhas mais comercializadas ao redor do mundo, os peixes de recife de coral são as mais negociadas. Neste cenário bilionário

impulsionado pela indústria cinematográfica, o peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* assumiu a posição de carro chefe em vendas sendo atualmente produzido em cativeiro por mais de 10 países, incluindo o Brasil (FAO, 2010; RHYNE *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2012; LADISA *et al.*, 2017; RHYNE *et al.*, 2017).

Contudo, essa intensificação de produção, apesar de aliviar os estoques pesqueiros reduzindo a captura, promoveu o aumento de enfermidade devido a fatores estressantes de cultivo. Dentre os principais problemas que acometem os peixes marinhos, a infecção por bactéria destaca-se (FIORAVANTI & FLORIO, 2017). Bactérias patogênicas como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* já foram isoladas de palhaços doentes (DHAYANITHI *et al.*, 2010) sendo este um problema tanto para os peixes, quanto para o homem.

Vibriose

A vibriose é a patologia de organismos marinhos mais comum em todo o mundo, responsável por grande surto de mortalidade (LAFFERTY *et al.*, 2018). Os vibrios são bactérias flageladas, gram negativas e facultativas anaeróbicas capazes de fermentar glicose e produzir toxinas (SAWABE *et al.*, 2013; ROUX *et al.*, 2015). Seu gênero apresenta mais de 100 espécies, contudo algumas destas bactérias são amplamente reportadas na literatura como patógeno para humanos e peixes, sendo estas o *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio Anguillarum*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio fluvialis* (ROONESETH *et al.*, 2017; RAMAMURTHY *et al.*, 2014).

O *Vibrio alginolyticus* e *parahaemolyticus* já foram reportados em peixes de grande valor econômico como o palhaço *Amphiprion sabae*, o peixe listrado *Ishidai Oplegnathus fasciatus* e a garoupa *Epinephelus lanceolatus*. Uma característica comum observada é capacidade destes patógenos em promover a mortalidade dos peixes em baixas concentrações (DHAYANITHI *et al.*, 2010; DHAYANITHI *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018).

O *Vibrio anguillarum* também apresenta alta virulência, característica específica de bactérias patogênicas do sorotipo O1, sendo relatada sua presença em Salmão *Gairdneri Richardson*, bodião reticulado *Labrus bergylta* e truta arco-iris *Oncorhynchus mykiss* (EGIDIUS & ANDERSEN, 1978; BIERING *et al.*, 2016).

No entanto, o *Vibrio cholerae* sorotipo O1 se destaca mundialmente por ser um problema de saúde pública. Esta bactéria é responsável por produzir toxinas específicas que provocam a cólera. Além de infectar humanos, na literatura existem relatos de infecções em peixes tornando o problema ainda maior (DU-PREEZ *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012; HOUNMANOU, 2015).

Contudo, foi descoberto que outra bactéria chamada *Vibrio fluvialis* é capaz de produzir as mesmas enterotoxinas específicas do *Vibrio cholerae*, as quais determinam sua virulência e patogenicidade (KOTHARY *et al.*, 2003).

Vibrio fluvialis é uma bactéria marinha flagelada halofílica gram negativa patogênica (AUSTIN, 2010). Seu primeiro relato de caso ocorreu nos Estados Unidos em 1982 quando foi descrita e caracterizada como zoonose em um surto de infecção intestinal atingindo mais de 500 pacientes (TACKET *et al.*, 1982). No Brasil, o primeiro relato de infecção por *Vibrio fluvialis* foi em 1990 associado a diversos pacientes com casos de diarreia (MAGALHÃES *et al.*, 1990).

Além de diarreia, também já foram documentados vários outros sintomas referentes a esta bactéria como otites, inflamação ocular, inflamação peritoneal, inflamação do trato biliar, celulite hemorrágica e abscesso cerebral (YOSHII *et al.*, 1987; PENLAND *et al.*, 2000; CABRERA *et al.*, 2005; HUANG & HSU, 2005; LAI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008). De acordo com Amel *et al.* (2008) é uma bactéria extremamente resistente podendo manter-se viável e virulenta por mais de 6 anos em condições desfavoráveis ao seu crescimento ou em total escassez de nutrientes.

Em ambiente aquático o *Vibrio fluvialis* é amplamente distribuído por todo o mundo, sendo reportado infecções em peixes, moluscos e crustáceos (KELLY & STROH, 1988; ALAVANDI *et al.*, 2004; YUSEL & BALCI, 2010b; SONIA & LIPTON, 2012). É considerado um patógeno de risco para aquicultura devido a sua resistência a diversos antibióticos (FRI *et al.*, 2018) e sua alta virulência para peixes (PEDERSEN *et al.*, 1999; KOTHARY *et al.*, 2003).

Na China já foi reportado grandes surtos de mortalidade em produção de carpas e moluscos infectados por *Vibrio fluvialis* (YIN *et al.*, 1993) mostrando a capacidade desta bactéria em infectar organismos de ambos ambientes, dulcícola e marinho. Desta forma é inegável que este patógeno promove riscos não apenas à saúde pública, mas também para animais e meio ambiente.

Riscos à Saúde Pública

O meio ambiente apresenta forte relação com a saúde pública devido ao grande número de agentes com potencial zoonótico. Nesse contexto, as bactérias destacam-se como o principal tipo de zoonose fornecendo riscos tanto para homens quanto para animais (GAUTHIER, 2015; MORAES & JORDÃO, 2012). Para o controle dessas infecções, os antibióticos ainda são os quimioterápicos mais usados atualmente em todo o mundo (BANIN *et al.*, 2017).

Na aquicultura, o uso de antibiótico para o controle de enfermidades é comum entre produtores. Os principais mais usados são eritromicinas, estreptomicinas e

oxytetraciclina (NEOWAJH *et al.*, 2015). Os resíduos deixados por estes antibióticos em corpos hídricos são um dos principais fatores para promover a seleção de bactérias mais resistentes. Mesmo para aqueles que são foto degradáveis como a oxytetraciclina ainda é possível observar resíduos (REYES *et al.*, 2006).

Assim, problemas com bactérias resistentes vem aumentando com o passar dos anos, sendo considerado um grave problema de saúde pública global. Estes microorganismos passam por mutações genéticas e alterações morfológicas tornando-se menos susceptíveis a ação de um específico antibiótico ou de diversos antibióticos (WALKER & FOWLER, 2011; HAMPTON, 2013). A exemplo disto está a bactéria gram-negativa *Vibrio fluvialis*, patógeno zoonótico de alta virulência reportado pela primeira vez em 1982, mostra-se atualmente um microorganismo resistente ao uso de vários antibióticos (Amel *et al.*, 2008; FRI *et al.*, 2018).

Apesar de sua importância para medicina moderna, o uso de antibióticos atualmente vem perdendo espaço para alternativas ambientalmente menos agressivas de forma a evitar patógenos multirresistentes. Na aquicultura, uma alternativa ambientalmente correta já conhecida para evitar o uso de antibióticos é a suplementação probiótica. Microorganismos com potencial probiótico vem sendo cada vez mais usados para promover maior resistência do hospedeiro a infecções por bactérias patogênicas (JATOBA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2018).

Probiótico

A primeira definição de probiótico foi realizada por Crawford (1979) como microorganismos vivos específicos inseridos no trato intestinal do hospedeiro. Anos depois a definição foi mais detalhada por Fuller (1991) agregando o termo “suplementação probiótica” baseada em microorganismos vivos específicos que atuam diretamente no balanço da microbiota intestinal. Contudo, Gram (1999) ampliou o conceito definindo probiótico como qualquer microorganismo que promova benefícios ao hospedeiro, mas não necessariamente associado a uma suplementação dietética.

Para a aquicultura, o conceito mais aceito está relacionado a Verschuere (2000) que define probiótico como qualquer microorganismo vivo que promova mudanças na microbiota intestinal do hospedeiro, ou na comunidade microbiana aquática. Com o passar dos anos, a definição foi atualizada afirmando que estes microorganismos poderiam atuar na inibição de patógeno (GATSOUPE *et al.*, 2008). Atualmente o probiótico é definido como qualquer microorganismo vivo suplementado a dieta do animal que promova benefícios a saúde como a melhora em desempenho zootécnico e de seu sistema imune (SAYES *et al.*, 2018).

As bactérias estão entre os microorganismos vivos mais usados como probiótico na aquicultura, sejam elas gram positivas ou gram negativas (LEE *et al.*, 2017; DE CORTÁZAR, 2017). Uma das premissas para ser considerado um candidato a probiótico é a capacidade de resistir a fatores adversos presentes no trato intestinal do hospedeiro como acidez do estômago e atividade da bile (VIEIRA *et al.*, 2013). Dentre as bactérias probióticas, destacam-se as bactérias ácido lácticas por não apresentarem riscos à saúde ou meio ambiente (SAYES *et al.*, 2018).

As bactérias ácido lácticas (BALs) são gram positivas e negativa para produção de catalase. São bactérias não esporuladas com formato de coccus ou bacillus, produtoras de compostos antimicrobianos. Podem ser divididas em dois grupos, homofermentativas por sua produção de ácido láctico através da quebra de glicose e bacteriocinas, e heterofermentativa com a produção de outras substâncias além do ácido láctico e bacteriocinas tais como etanol, ácido acético e dióxido de carbono (KONINGS, 2002; MAYO *et al.*, 2010).

Exemplos de bactérias ácido lácticas usadas na aquicultura são *Bacillus subtilis*, *Bacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus casseiflavus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactici* (PARK *et al.*, 2017; SAFARI *et al.*, 2016; NANDI *et al.*, 2017; DAWOOD *et al.*, 2015; MUNÓZ-ATIENZA *et al.*, 2014; MEIDONG *et al.*, 2017; YAMASHITA *et al.*, 2007; SON *et al.*, 2009; GIRI & OVIYA, 2013; RODRIGUEZ-ESTRADA *et al.*, 2013; CHANG & LIU, 2002; CARNEVALI *et al.*, 2006; JATOBA *et al.*, 2018; PIMENTEL & KATAGIRI, 2008; CHEN *et al.*, 2008; KANE *et al.*, 2016).

Segundo os mesmos autores, a suplementação probiótica com as bactérias ácido lácticas promoveram maior ganho de peso, maior taxa de crescimento específico, melhor conversão alimentar aparente, maior sobrevivência durante o cultivo, modulação da microbiota intestinal, aumento das vilosidades intestinais, melhor digestão e absorção de nutrientes, melhora do sistema imunológico e aumento da resistência a infecções por vírus e bactéria.

Essa melhora imunológica é observada através de exames de sangue que mostraram uma modulação dos parâmetros hematológicos com uso do probiótico (YAMASHITA *et al.*, 2007). Parâmetros hematológicos são usados atualmente como uma ferramenta eficaz para indicar o estado de saúde dos peixes (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013; MOHAPATRA *et al.*, 2014). De acordo com Telli *et al.* (2014) tilápias alimentadas com dieta suplementadas com *Bacillus subtilis* apresentaram maior número de trombócitos. Esse aumento específico provido pela suplementação

probiótica permitiu uma maior capacidade fagocítica de bactérias patogênicas (KOLMAN *et al.*, 2003).

O aumento de leucócitos de forma geral permite uma maior capacidade fagocítica contra patógenos. Isso é relatado para garoupas *Epinephelus coioides* alimentadas com *Lactobacillus plantarum* que mostraram maior resistência a infecção por vírus (*Iridovirus*) e bactéria (*Streptococcus* sp), fato este atribuído a sua maior capacidade fagocítica (SON *et al.*, 2009). Para carpas *Labea rohita*, a alimentação *L. plantarum* também promoveu aumento de células de defesa permitindo uma maior resistência a infecções por *Aeromonas hydrophila* (GIRI & OVIYA, 2013).

Em patógenos marinhos como *Aeromonas salmonicida*, a suplementação probiótica atua da mesma forma promovendo o aumento da resistência dos animais a infecção (PARK *et al.*, 2017). Contra o *Vibrio alginolyticus*, uma das principais bacterioses que acometem peixes marinhos (FIORAVANTI & FLORIO, 2017), foi descrito na literatura que o uso do probiótico para o peixe ornamental marinho Ishidai *Oplegnathus fasciatus* aumentou a quantidade de leucócitos e sua capacidade fagocítica implicando em uma maior resistência a infecção (LIU *et al.*, 2018).

Todos estes benefícios, do desempenho zootécnico à melhora imunológica, estão associados de forma direta e indireta ao epitélio intestinal. O uso de bactérias probióticas promovem alterações específicas como o aumento das vilosidades intestinais (MELLO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015). Esse aumento de vilosidades permite uma maior absorção alguns nutrientes como amino ácidos e vitaminas. O aumento de vitaminas é um dentre vários fatores que promovem a melhora do sistema imunológico como o aumento de leucócitos (SHAHKAR *et al.*, 2015).

Neste sentido, sua aderência no trato intestinal e capacidade de colonização são fatores que determinam o sucesso da suplementação probiótica. Por este motivo o uso de bactérias autóctones é constantemente citado por alguns autores devido a sua melhor aderência e colonização, características estas que tornam um probiótico autóctone melhor que um alóctone (BALCAZAR *et al.*, 2006) A exemplo, de acordo com Jatobá *et al.* (2018) a bactéria *Lactobacillus plantarum* autóctone apresentou rápida colonização e promovendo benefícios ao seu hospedeiro, fato este não observado por um probiótico alóctone segundo Hura *et al.* (2018). No entanto, apesar dos grandes avanços e diversos relatos sobre o uso de probiótico autóctone em peixes nos últimos anos, ainda existem espécies de importância econômica e social que precisam ser estudadas como o peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*.

CAPÍTULO 2

Metodologia

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUAs) da Universidade Tiradentes com numeração 010218.

Local de pesquisa

O estudo foi realizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros na cidade de Aracaju no estado de Sergipe pelo Laboratório de Aquicultura (LAQUA).

1-Isolamento das bactérias

As bactérias com potencial probiótico foram isoladas de seis peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* (Oriundos de fazenda aquícola em Recife, São Paulo e Manaus) de aspecto saudável com peso médio $0,46 \pm 0,01$ g. Os peixes selecionados foram animais que não tiveram qualquer alimentação industrializada, alimentando-se apenas por zooplâncton., peixes marinhos e crustáceos. Os peixes foram previamente anestesiados por benzocaina 20mg/L (PRAMOD *et al.*, 2010) e levados até o último plano anestésico, submetidos a eutanásia por secção medular. Posteriormente seu trato intestinal foi removido e macerado em solução salina estéril (SSE) a 1,5% de NaCl. O conteúdo macerado foi conduzido a diluição seriada com fator de 1:10mL em meio de cultura específico De Man Rugosa Sharped (MRS) suplementado com NaCl 1,5%. As diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram inoculadas em placas *petri* contendo mesmo meio de cultura solido MRS ágar suplementado com 1% de azul de anilina para identificação de bactérias ácido lácticas. Após inoculação, as placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 35°C (adaptado de Jatoba *et al.*, 2008 quanto a concentração salina dos meios).

Após o crescimento bacteriano, foram selecionadas colônias de cor azul com morfologia de cocos ou bastonetes para testes preliminares como identificação do gram e determinação da produção de catalase (VIEIRA *et al.*, 2013). As colônias gram-positivas de catalase negativa foram selecionadas e inoculadas em novas placas *petri* com meio de cultura MRS agar para purificação e isolamento através da técnica de esgotamento segundo metodologia adaptada por Ramirez *et al.* (2006).

2-Cinética de crescimento

Para a determinação da curva de crescimento das bactérias ácido lácticas isoladas, as cepas foram inoculadas em caldo de meio MRS e crescidas em estufa a 35° por 24 horas. A cada duas horas uma alíquota de 1mL foi retirada para leitura em espectrofotômetro (630nm de absorvância). Em paralelo, placas petri com meio MRS ágar foram inoculadas com as bactérias em crescimento. Ao final os valores de absorvância foram convertidos em Unidades Formadoras de Colônia através de uma regressão exponencial. Com os dados finais foram estimadas equações de velocidade máxima (Eq.1) e tempo de duplicação (Eq. 2) (RAMIREZ *et al.*, 2016) onde (Z) é a concentração final, (Z0) é concentração inicial e (dt) o tempo de cultivo em horas.

(Eq. 1)

$$\mu_{max} = \frac{\ln(z) - \ln(Z0)}{dt}$$

(Eq. 2)

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}$$

3-Testes *in vitro*

3.1-Tolerância ao pH, NaCl e sais biliares

A metodologia de Ramirez (2005) foi adaptada para as bactérias de ambientes marinhos, a cepas com potencial probiótico, previamente isoladas, foram inoculadas em caldo MRS com fator de 1:10mL em diferentes concentrações de NaCl, pH e sais biliares. Dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) foram conduzidos com 4 tratamentos e cinco repetições sendo: resistência a diferentes concentrações de NaCl (0; 1,5; 3,0 e 4,5%) e diferentes pH (2,5; 5,0; 7,5 e 9,0). A tolerância por sais biliares (Bile bovina) foi realizada com adição de 5% (p/v) com cinco repetições e um controle sem bile bovina também com cinco repetições. Após inoculação, as cepas com potencial probiótico foram incubadas em estufa microbiológica a 35°C por 24 horas. Após incubação, foram conduzidas a espectrofotometria para determinação da porcentagem da redução em absorvância comparada ao controle (VIEIRA *et al.*, 2013).

3.2-Inibição de patógenos

Por metodologia adaptada de Ramirez *et al.* (2006), foi determinado o potencial antagonístico das cepas bacterianas isoladas frente a patógenos como *Aeromonas hydrophila* (CPQBA22808 DRM), *Aeromonas jandaei* (LAQUA), *Enterococcus duran* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Vibrio parahaemolyticus* (LAQUA), *Vibrio fluvialis* (LAQUA), *Shewanella putrefaciens* (LAQUA) e *Citrobacter freundii* (LAQUA), fornecidas pelo Laboratório de Camarão Marinho (LCM) em Santa Catarina e pelo Laboratório de Aquicultura (LAQUA) na Embrapa Tabuleiros Costeiros em Sergipe.

Para isso, as cepas com potencial probiótico previamente isoladas foram crescidas em caldo MRS a 35°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, estas foram inoculadas (100µL) em placas *petri* contendo meio de cultura MRS ágar e novamente incubadas a 35°C por 48 horas. Finalizada a incubação, seis discos com diâmetro de 0,8cm foram seccionados de cada placa mais um controle positivo (antibiótico Oxytetraciclina 3mg/L em agar estéril sem bactérias crescidas) e alocados em novas placas de petri contendo meio de cultura Triptona de Soja Agar (TSA). Os patógenos descritos acima foram previamente inoculados nestas placas com meio de cultura TSA antes da alocação dos discos testes. Após incubação a 35° por 24 horas, foi determinado o diâmetro dos halos de inibição (mm) das bactérias ácido lácticas frente aos patógenos (Figura 2).

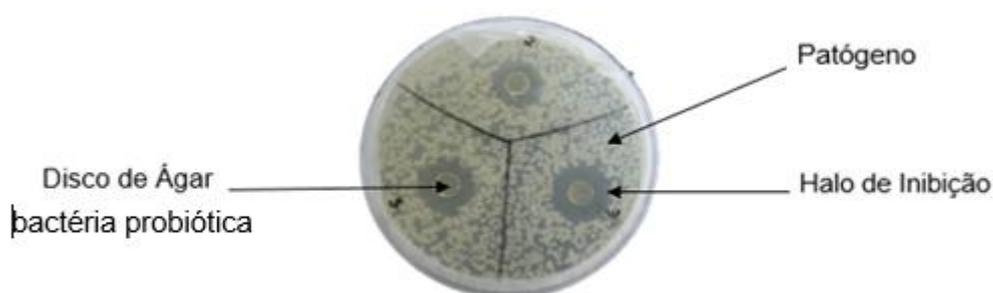


Figura 2. Teste in vitro da inibição de patógeno em placa petri

3.4-Identificação por espectrometria de massas

A bactéria selecionada com melhor resultado in vitro foi submetida a identificação por técnica de MALD-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption

Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) determinando o peso molecular das proteínas ribossomais (<500000 Dalton) por um pulso de laser 260-337nm (KARAS *et al.*, 1987; KARAS & HILLENKAMP, 1988). Após crescimento da bactéria em meio solido MRS agar, as colônias isoladas foram coletadas e alocadas em um alvo de metal inoxidável por meio de esfregaço. Posteriormente 1µL de uma solução matriz (Ácido-a-ciano-4-hidroxi-cinâmico números 8855344) foi adicionado ao esfregaço e deixado secar em temperatura ambiente. Uma solução padrão (*Bacterial Test Standart* number 8855343 de *Escherichia coli*) foi usada em alvo adjacente à bactéria teste, para ser utilizada como calibrador padrão do equipamento. Espectros foram gerados e analisados pelo sistema operacional *Maldi Biotyper Compass 1.4* e *Flex Control* fornecidos pela empresa *Bruker Daltonics Inc Bremer Alemanha*. Os picos espectrais encontrados foram comparados com uma biblioteca fornecida pela empresa. Score com valores $\geq 1,7$ foram considerados para identificação em nível de gênero e espécie para as bactérias gram-positivas (TEKIPPE *et al.*, 2012).

3.5-Concentração na ração

A cepa isolada, selecionada e identificada foi então crescida em caldo MRS, submetida a diluição seriada (fator 1:10) e inoculada em 1mL/10grama de ração em três concentrações (10^4 , 10^6 e 10^8 UFC de bactéria ácido láctica/g de ração). Em seguida a ração foi colocada em estufa para secagem a 35°C por 48 horas. Depois da secagem, amostras de 1 grama de ração foram macerados em cadinho de porcelana contendo solução salina estéril (NaCl 1,5%) e diluído serialmente (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9}). As diluições foram inoculadas em placas *petri* com meio solido MRS agar e incubadas a 35°C por 48 horas (Jatoba *et al.*, 2008) e posteriormente as UFC foram contadas. Amostras das rações inoculadas também foram mantidas em geladeira para estimativa do tempo de prateleira determinado também da contagem de UFC/g a cada 3 dias.

4-Teste *in vivo*

O experimento foi realizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo Laboratório de Aquicultura. Um delineamento inteiramente casualizado foi conduzido com quatro tratamentos de suplementação probiótica (10^4 ; 10^6 ; 10^8 UFC/grama de ração e um Controle sem probiótico) e três repetições. Para tanto foram usados cento e vinte (120) peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* com peso médio $0,46\pm 0,01$ g, adquiridos de fazenda aquícola em Recife. Os animais foram aclimatados e alocados em aquários

de vidro (capacidade para 80L) interligados a um sistema de recirculação de água com densidade de 10 peixes por aquário (KODAMA *et al.*, 2011).

A alimentação foi realizada com ração específica para peixes ornamentais marinhos (Tetra Marine Granules – Proteína Bruta 44%; Extrato Etéreo 11%; Fibra 2%; Minerais 9%; enriquecida com Vitamina C e ácidos graxos Ômega-3) suplementada com a bactéria probiótica como descrito anteriormente. A taxa e frequência alimentar foram definidas em 4% do peso vivo e frequência de 3 vezes ao dia (9, 12 e 17 horas) de acordo com (JOHNSTON *et al.*, 2003). Os parâmetros de qualidade de água foram mantidos em salinidade $30,00 \pm 0,48$ ppt, temperatura $28,07 \pm 0,54$ C°, pH $8,16 \pm 0,06$, $6,48 \pm 0,36$ e amônia total $0,29 \pm 0,10$ mg/L.

4.1-Desempenho zootécnico

O experimento teve um total de 90 dias com biometrias mensais (30, 60 e 90 dias) aferindo peso e comprimento (comprimento total, comprimento padrão, altura. Para tanto, os animais foram previamente anestesiados por banho de imersão em solução de benzocaina 20mg/L (Pramod *et al.*, 2010). Foram então determinados os parâmetros de ganho de comprimento total (GPT= Comprimento total final – comprimento total inicial), ganho de comprimento padrão (GPP= Comprimento padrão final – comprimento padrão inicial), ganho em altura (ALT= Altura final – altura inicial) ganho de peso (GP= Peso final – peso inicial), ganho de biomassa (GB= Biomassa final – biomassa inicial), taxa de crescimento específico (TCE= \ln peso final – \ln peso inicial / dias de experimento x 100), conversão alimentar aparente (CAA= Consumo de ração / Ganho de peso), consumo de ração (CR= Peso inicial da ração – Peso final da ração), fator de condição relativo (KR= \ln do peso final / b x \ln comprimento final – a), sobrevivência (S= Número de peixes final / número de peixes inicial x 100) e uniformidade (U Peixes dentro dos $\pm 20\%$ do peso médio / total de peixes x 100).

4.2-Hemograma

Com auxílio de seringas esterilizadas e umedecidas com anticoagulante (EDTA 3%), 1mL de sangue foi coletado de 9 animais por tratamento via punção caudal e armazenado em eppendorf umedecidos com mesmo anticoagulante para posterior análise. O número total de eritrócitos ($\text{Cel} \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) foi estimado com contagem em câmara de Neubauer (GARCIA-NAVARRO, 2005) e a porcentagem de hematócrito pelo método de micro hematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971). As concentrações de hemoglobina (g.dL-1), glicose (mg.dL-1) e proteína plasmática total (g.dL-1) foram

estimadas com auxílio dos aparelhos analisador bioquímico, Prestige IQ 50 e refratômetro (Quimis®) respectivamente. Os índices hematimétricos foram calculados segundo metodologia de Vallada (1999) para Volume corpuscular médio (VCM= Hematócrito x 100 / Eritrócito; em fentolitros), Hemoglobina corpuscular média (HCM= Hemoglobina total x 10 / Eritrócitos, em picograma) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM= HCM x 100 / Hematócrito, em %). Para a contagem diferencial de 200 leucócitos em 2000 eritrócitos foram feitas extensões sanguíneas segundo metodologia de Ranzani-paiva (1995) e então coradas segundo metodologia de Rosenfeld (1947) para análise em microscópio.

4.3-Microbiologia

Ao final de 90 dias seis animais de cada tratamento foram eutanasiados e parte do trato intestinal foi seccionado de cada animal, mensurado seu comprimento, em seguida macerado em cadinho com 1mL de solução salina estéril (NaCl 1,5%) e submetido a diluição seriada (fator 1:10). As diluições 10^{-3} e 10^{-5} foram inoculadas em placas *petri* contendo meio sólido MRS Ágar e TSA Ágar para contagem de bactérias ácido lácticas e bactérias heterotróficas totais. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Todos os procedimentos microbiológicos descritos acima foram realizados em uma câmara de controle biológico de fluxo laminar.

5-Desafio com patógeno

Após o experimento com a suplementação probiótica de 90 dias, os peixes dos tratamentos foram submetidos ao desafio bacteriano.

5.1-Isolamento do patógeno

O patógeno utilizado no desafio experimental foi isolado de seis peixes palhaços *Amphiprion ocellaris* doentes com sinais de clínicos de bacteriose. Os animais foram eutanasiados como já descrito acima e então submetidos a procedimento cirúrgico para abertura de pequenas incisões abaixo da linha lateral. Através destas incisões foram realizados swabs estéreis do rim para inoculação em placas *petri* com meio de cultura Infusão cérebro-coração (BHI) salinizado a 1,5% (NaCl). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas, e após o crescimento bacteriano foi determinada características como a morfologia das colônias, coloração do gram e produção de catalase. As bactérias gram-negativas e

catalase positiva foram selecionadas e identificadas em nível de gênero e espécie pela técnica do MALDI-TOF-MS. Após identificação, a bactéria com maior crescimento foi selecionada e injetada em peixes sadios em proporção de 1×10^6 UFC/mL para determinação de sua virulência.

5.2-Aplicação do patógeno

O desafio experimental com bactéria patogênica previamente isolada e identificada como *Vibrio fluvialis* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para tanto, quarenta e cinco (45) peixes palhaços submetidos a 90 dias de suplementação probiótica, foram divididos em cinco tratamentos (Controle Solução salina estéril-SSE, Peixes sem suplementação probiótica, e peixes suplementados com 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/g) e três repetições. Os animais foram alocados em tanques com capacidade 10L com aeração constante em densidade de 1 peixe para cada dois litros. Em seguida foram aplicadas injeções intraperitoneais em proporção de 1mL/100g de peso vivo na concentração de 1×10^5 UFC/mL (Marudhupandi *et al.*, 2017). Após aplicação do patógeno, foram observados sinais clínicos a cada duas horas durante um período de noventa e seis (96) horas. Ao final do experimento foi determinada a sobrevivência de cada tratamento e os animais restantes foram anestesiados para coleta de sangue e eutanasiados para coleta de órgãos como fígado e rim para posterior análise e verificação do postulado de Koch.

6-Análise estatística

Os dados coletados dos testes *in vitro* foram submetidos a teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis seguido pelo post hoc Dunn ($p < 0,05$). Os valores de desempenho zootécnico e hematológicos, de acordo com as premissas de normalidade e homocedasticidade por Shapiro wilk e Bartlet respectivamente, foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e post hoc Tukey ($p < 0,05$). Os valores de sobrevivência em porcentagem foram transformados em arco seno raiz e então submetidos a estatística não paramétrica de Kruskal Wallis post hoc Dunn ($p < 0,05$).

Referencias

Alavandi, S. V., Vijayan, K. K., Santiago, T. C., Poornima, M., Jithendran, K. P., Ali, S. A., & Rajan, J. J. S. (2004). Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(2), 115-120.

Banin, E., Hughes, D., & Kuipers, O. P. (2017). Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 450-452.

Biering, E., Vaagnes, Ø., Krossøy, B., Gulla, S., & Colquhoun, D. (2016). Challenge models for atypical *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* in farmed Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and preliminary testing of a trial vaccine against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 39(10), 1257–1261. doi:10.1111/jfd.12450

Buglione-Neto, C., Mouriño, J. L., do Nascimento Vieira, F., da Silva, B. C., Jatobá, A., Seiffert, W., ... & Andreatta, E. (2013). Métodos para determinação da digestibilidade aparente de dietas para camarão marinho suplementadas com probiótico. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 48(8), 1021-1027.

Cabrera, R.L.E., Monroy, S.P., Morier, L., Ramírez, A.M.M., Fernández, A.A., Castro, E.G., et al. (2005). Severe otitis due to *Vibrio fluvialis* in a patient with AIDS: first report in the world. *Rev. Cubana Med. Trop.* 57, 154–155.

Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., & Cresci, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1-4), 430-438.

Cato, J.C., 2003. Marine ornamental Species: Collection, Culture and Conservation. Blackwell Publishing

Chang, C. I., & Liu, W. Y. (2002). An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*, 25(5), 311-315.

Chapman F.A., Fitz-Coy S.A., Thunberg E.M. and Adams C.M. 1997. United States of America trade in ornamental fish. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 1–10

Cohen, F. P., Valenti, W. C., & Calado, R. (2013). Traceability issues in the trade of marine ornamental species. *Reviews in Fisheries Science*, 21(2), 98-111.

Crawford, P., Brown, B., Nerlich, B., & Koteyko, N. (1979). on probiotics.

Dawood MA, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S. (2015). Effects of partial substitution of fish De Cortázar CLG. Efectos de la administración del probiótico *Shewanella putrefaciens*.

de Paiva, M. J. T. R., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., & Egami, M. I. (2013). *Métodos para análise hematológica em peixes*. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.

Dhaneesh, K. V., Ajith Kumar, T. T., & Shunmugaraj, T. (2009). Embryonic development of percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802). *Middle-east journal of scientific research*, 4(2), 84-89.

Dhayanithi, N. B., Ajith Kumar, T. T., & Kathiresan, K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*, 31(4), 409-412.

Dhayanithi, N. B., Kumar, T. T. A., Arockiaraj, J., Balasundaram, C., & Harikrishnan, R. (2015). Dietary supplementation of *Avicennia marina* extract on immune protection and disease resistance in *Amphiprion sebae* against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 45(1), 52-58.

Doktor, R., & Bui, T. (2018). The symbiotic relationship of entrepreneurship and information technology. *Int. J. Entrepreneurship and Small Business*, 33(4), 467.

du Preez, M., van der Merwe, M. R., Cumbana, A., and le Roux, W. (2010). A survey of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in estuarine waters and sediments of Beira, Mozambique. *Wat. SA* 36, 615–620. doi: 10.4314/wsa.v36i5.61995

Egidius E. & Andersen K. (1978) Host-specific pathogenicity of strains of *Vibrio anguillarum* isolated from rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and saithe *Pollachius virens* (L.). *Journal of Fish Diseases* 1, 45–50.

Fotedar, R., & Phillips, B. (Eds.). (2011). *Recent advances and new species in aquaculture*. John Wiley & Sons.

Fri, J., Ndip, R. N., Njom, H. A., & Clarke, A. M. (2018). Antibiotic Susceptibility of Non-Cholera Vibrios Isolated from Farmed and Wild Marine Fish (*Argyrosomus japonicus*), Implications for Public Health. *Microbial Drug Resistance*.

Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32(4), 439.

Giri, S. S., Sukumaran, V., & Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology*, 34(2), 660-666.

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I., & Nielsen, T. F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 969-973.

Hampton, T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. *JAMA* 310, 1661–1663 (2013).

Hoff, F. H. (1996). *Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish*. Aquaculture Consultants, Incorporated.

Hounmanou, Y. M. G. (2015). *Virulence Characteristics and Antibiotic Susceptibility of Vibrio cholerae in Low Quality Water, Fish and Vegetables in Morogoro, Tanzania*. A thesis submitted for the degree of Master of Science, Morogoro, Skoine University of Agriculture, 59

Huang, K.C., & Hsu, R.W. (2005). *Vibriofluvialis* hemorrhagic cellulitis and cerebritis. *Clin. Infect. Dis.* 40, 75–77. doi:10.1086/429328

Jatobá, A., do Nascimento Vieira, F., Neto, C. B., Silva, B. C., Mouriño, J. L. P., Jerônimo, G. T. & Martins, M. L. (2008). Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(9), 1201-1207.

Johnston, G., Kaiser, H., Hecht, T., & Oellermann, L. (2003). Effect of ration size and feeding frequency on growth, size distribution and survival of juvenile clownfish, *Amphiprion percula*. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(1), 40-43.

Kane, A. M., Soltani, M., Ebrahimzahe-Mousavi, H. A., & Pakzad, K. (2016). Influence of probiotic, *Lactobacillus plantarum* on serum biochemical and immune parameters in vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against streptococcosis/lactococcosis. *International Journal of Aquatic Biology*, 4(4), 285-294.

Kelly, M. T., Stroh, E. M. (1988). Occurrence of Vibrionaceae in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 1–5. doi:10.1016/0732-8893(88)90054-5.

Kodama, G., Annuniação, W. F., Sanches, E. G., Gomes, C. H. A. M., & Tsuzuki, M. Y. (2011). Viabilidade econômica do cultivo do peixe palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(1), 61-72

Kolman, H., Terech-Majewska, E., Kolman, R., Szarek, J., & Swiatecki, A. (2003). The ingestion of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* by fish blood phagocytes in vitro under influence of herbicides. *Acta Scientiarum Polonorum. Piscaria*, 2(1)..

Konings, W. N. (2002). The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, pp. 3–27.

Kothary, M. H., Lowman, H., McCardell, B. A., & Tall, B. D. (2003). Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. *Infection and immunity*, 71(6), 3213-3220.

Kumar, P., Jain, M., Goel, A. K., Kamboj, D. V., & Kumar, O. (2012). Tetracycline resistant *V. cholerae* O1 biotype El Tor serotype Ogawa with classical *ctxB* from a

recent cholera outbreak in Orissa, Eastern India. *Journal of infection and public health*, 5(2), 217-219.

Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics.

Lee, J. Y., Park, J. S., Oh, S. H., Kim, H. R., Lee, J. N., & Shin, J. H. (2008). Acute infectious peritonitis caused by *Vibrio fluvialis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 62(2), 216-218.

Liu, W. L., Chiu, Y. H., Chao, C. M., Hou, C. C., e Lai, C. C. (2011). Biliary tract infection caused by *Vibriofluvialis* in an immunocompromised patient. *Infection* 39, 495–496. doi:10.1007/s15010-011-0146-0

Magalhães, V., Lima, R. A., Magalhães, E., and Magalhães, M. (1990). Human gastroenteritis associated with *Vibriofluvialis* in Recife. *Arq. Gastroenterol.* 27, 141–143.

Mayo, B., Aleksandrzyk, T., Fernandez, M., Kowalczyk, M., Alvarez Martin, P. and Bardowski, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, pp. 3–33.

Mello, H. D., Moraes, J., Niza, I. G., Moraes, F. R. D., Ozório, R., Shimada, M. T. & Claudiano, G. (2013). Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 724-730.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Baker, R. T. M., & Davies, S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture nutrition*, 16(5), 496-503.

Militz, T. A., & Foale, S. (2017). The “Nemo Effect”: perception and reality of Finding Nemo's impact on marine aquarium fisheries. *Fish and Fisheries*, 18(3), 596-606.

Mohapatra, S., T. Chakraborty, A. Prusty, K. Pani Prasad & K. Mohanta. (2014). Beneficial effects of dietary probiotics mixture on hemato-immunology and cell apoptosis of *Labeo rohita* fingerlings reared at higher water temperatures. *PLoS ONE*, 9(6): 1-9.

Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., & Love, J. C. (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. 2. Singapore: Wiley-Blackwell.

Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of applied microbiology*, *103*(5), 1699-1706.

Özogul, F., & Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *58*(10), 1660-1670.

Pedersen, K., Grisez, L., Van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., & Larsen, J. L. (1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current microbiology*, *38*(3), 183-189.

Penland, R. L., Boniuk, M., Wilhelmus, K. R. (2000). *Vibrio* ocular infections on the U.S. Gulf Coast. *Cornea* *19*, 26–29. doi:10.1097/00003226-200001000-00006

Pimentel, S. S., & Katagiri, T. (2008). Differences of Probiotic Effects on *Edwardsiella tarda* Challenged Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed with Four *Lactobacillus* Species. *Aquaculture Science*, *56*(3), 401-408..

Pramod, P. K., Sajeevan, T. P., Ramachandran, A., Thampy, S., & Pai, S. S. (2010). Effects of two anesthetics on water quality during simulated transport of a tropical ornamental fish, the Indian tiger barb *Puntius filamentosus*. *North American Journal of Aquaculture*, *72*(4), 290-297

Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014). *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Frontiers in microbiology*, *5*, 91.

Ramírez, N. C. (2016). Avaliação do uso de sais orgânicos em conjunto com probióticos no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

Rønneseth, A., Castillo, D., D'Alvise, P., Tønnesen, Ø., Haugland, G., Grotkjær, T. & Gram, L. (2017). Comparative assessment of *Vibrio* virulence in marine fish larvae. *Journal of fish diseases*, *40*(10), 1373-1385.

Rosenfeld, G. (1947). Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, 20, 315-328.

Roux, F. L., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C. & Mazel, D. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in microbiology*, 6, 830.

Safari, R., Adel, M., Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Dadar, M. (2016). Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish & shellfish immunology*, 52, 198-205.

Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Gao, F., Amin, A. K. M., Mino, S., ... & Satomi, M. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in microbiology*, 4, 414.

Sayes, C., Leyton, Y., & Riquelme, C. (2018). Probiotic Bacteria as an Healthy Alternative for Fish Aquaculture. In *Antibiotic Use in Animals*. InTech.

Silva, T. F. A., Petrillo, T. R., Yunis-Aguinaga, J., Marcusso, P. F., da Silva Claudiano, G., de Moraes, F. R., & de Moraes, J. R. E. (2015). Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(5), 963-971.

Son, V. M., Chang, C. C., Wu, M. C., Guu, Y. K., Chiu, C. H., & Cheng, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5), 691-698.

Su, B. C., Lin, W. C., & Chen, J. Y. (2018). Recombinant *Epinephelus lanceolatus* serum amyloid A as a feed additive: Effects on immune gene expression and resistance to *Vibrio alginolyticus* infection in *Epinephelus lanceolatus*. *Fish & shellfish immunology*, 76, 233-239.

Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J. T., de Carla Dias, D., Sussel, F. R., Ishikawa, C. M., & Tachibana, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & shellfish immunology*, 39(2), 305-311.

Vallada, E. P. (1988). *Manual de técnicas hematológicas*. Atheneu.

Veron, J.E.N., (2000). *Corals of the World*, Australian Institute of Marine Science, vol. 1, 2, 3.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.

Wabnitz, Colette. (2003) *From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species*. UNEP/Earthprint.

Walker, D. & Fowler, T. Annual Report of the Chief Medical Officer: Volume Two, 2011: Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance (Department of Health, 2011).

Wittenrich ML (2007) *The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes*. TFH Publications Inc, Neptune City, NJ, USA.

Xu B.H., Yin Z., Wu Y.S. & Cai T.Z. (1993) Studies on the taxonomy of pathogenic bacteria of the bacterial hemorrhagic septicemia in cultured fishes in freshwater. *Acta Hydrobiologica Sinica* 17, 259-266.

Yamashita MM, Pereira SA, Cardoso L, et al. Probiotic dietary supplementation in Nile Yoshii, Y., Nishino, H., Satake, K., and Umeyama, K. (1987). Isolation of *Vibrio fluvi- alis*, and unusual pathogen in acute suppurative cholangitis. *Am. J. Gastroenterol.* 82, 903–905.

Yücel, N., and Balci, S. (2010). Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. *J. Food Prot.* 73, 380–384.

Zuanon, J. A. S., Salaro, A. L., & Furuya, W. M. (2011). Produção e nutrição de peixes ornamentais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 165-174.

CAPITULO 3

Seleção in vitro de bactéria autóctone com potencial probiótico para a criação em cativeiro do peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris*)

In vitro selection of autochthone bacteria with probiotic potential for captivity culture of clownfish (*Amphiprion ocellaris*)

Resumo

O objetivo do presente estudo foi isolar e testar in vitro bactérias autóctones com potencial probiótico do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*. Para tanto, palhaços com aspectos saudáveis foram anestesiados e submetidos a eutanásia para amostragem das bactérias. As bactérias foram isoladas do trato intestinal em meio de cultura específico para crescimento de bactérias ácido lácticas MRS agar. Após isolamento, as cepas de bactérias gram positivas e catalase negativas foram submetidas a testes de resistência ao NaCl (0,0; 1,5; 3,0 e 4,5%), pH (2,5; 5,0; 7,5; 9,0) e sais biliares (5% peso/volume). A avaliação foi realizada pela determinação da cinética de crescimento e número total de células viáveis em unidades formadoras de colônias. Por fim, foi realizada a avaliação da capacidade antagônica frente a bactérias patogênicas tanto gram-positivas quanto negativas. Um total de cinco bactérias gram-positivas com morfologia de cocos (3) e bastonetes (3) foram selecionadas (CP1; CP2; CP3; CP4 e CP5 sendo Bacilocos, cocos, coco, cocos e bacilocos) para os testes in vitro. A cepa cinco (CP5) identificada pela técnica de MALDI-TOF-MS como *Lactobacillus plantarum* apresentou os melhores resultados para os testes de resistência ao NaCl e pH bem como melhor capacidade antagônica frente a patógenos. A cepa quatro (CP4) mostrou os piores valores para resistência e antagonismo. Assim, *Lactobacillus plantarum* apresenta-se como um potencial probiótico para peixe palhaço.

Palavra-chave: Ornamental, probiótico, palhaço

Abstract

The aim of study was to isolate and to test in vitro conditions potential autochthonous probiotic bacteria from clownfish *Amphiprion ocellaris*. Six clownfish with physical aspects were anesthetized and euthanized for sampling the bacteria. Bacteria were isolated from their intestine in specific culture medium for the growth of lactic acid bacteria (MRS agar). After isolation, the strains were submitted to NaCl (0.0, 1.5, 3.0 and 4.5%), pH (2.5, 5.0, 7.5, 9) and bile salts (5% w / v) assays. The

evaluation of bacterial resistance was performed by growth kinetics and counting of total number of viable cells in colony forming units. Finally, an antagonistic evaluation test was performed to against pathogenic gram positive and negative bacteria. A total of five gram-positive bacteria with coccus and bacilli morphology were selected (CP1, CP2, CP3, CP4 and CP5) for the testes. The strain 5 (CP5) was identified by the MALDI-TOF-MS technique as *Lactobacillus plantarum*. This strain presented better on NaCl and pH resistance as well as better antagonistic capacity against pathogens. Thus, the *Lactobacillus plantarum* was presented as potential probiotic bacteria to clownfish culture.

Key-words: Ornamental, probiotic, clownfish.

Introdução

A aquicultura ornamental vem crescendo cada vez mais ao longo dos anos (FAO, 2018). Com o aumento de produtividade, surtos de doenças tornam-se cada vez mais comuns devido a altas densidades de estocagem e manejos inadequados em cativeiro (PAVANELLI *et al.*, 2008). Neste cenário, o probiótico surge como uma alternativa sustentável ao uso de antibióticos para o controle de enfermidades.

Probiótico é definido como microorganismos vivos suplementados a dieta, que promove benefícios ao seu hospedeiro (SAYES *et al.*, 2018). Nos últimos anos, vários trabalhos vêm sendo publicados sobre o uso de probiótico autóctone na aquicultura tal como *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* (JATOBA *et al.*, 2008) *Lactobacillus acidophilus* (ALY *et al.*, 2008) *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* (MERRIFIELD *et al.*, 2010b) *Bacillus* sp. (NADI *et al.*, 2017) *Bacillus subtilis* (LIU *et al.*, 2018) e *Bacillus velezensis* (YANGLEI *et al.*, 2018).

Contudo, a primeira etapa para se determinar o potencial probiótico são os testes *in vitro* (VIEIRA *et al.*, 2013). A capacidade de colonização do trato intestinal do hospedeiro é de fundamental importância para promover benefícios ao hospedeiro (BALCÁZAR *et al.*, 2006). Assim, testes específicos como resistência ao potencial hidrogeniônico similares aos do estômago e intestino como também à atividade enzimática dos sais biliares determinam a eficiência da bactéria selecionada para uso como probiótico (VIEIRA *et al.*, 2013).

Atualmente, são poucos os estudos com uso de probiótico para peixe palhaço (WESSELING *et al.*, 2015) sendo o uso de probiótico autóctone inexistente na literatura para a espécie *Amphiprion ocellaris*. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi isolar e testar *in vitro* bactérias autóctones com potencial probiótico para peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* em cativeiro.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na Embrapa Tabuleiros costeiros pelo laboratório de aquicultura (LAQUA). Para tanto, seis (06) peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* saudáveis foram anestesiados por imersão em solução de benzocaina 20mg/L (PRAMOD *et al.*, 2010) e então submetidos a eutanásia por secção medular de acordo com termos de bem-estar animal (CEUA número 01022018). Em seguida seu trato intestinal foi removido e macerado em solução salina estéril (SSE NaCl 1,5%), conduzido a diluição seriada (Fator 1:10) e inoculado em placas petri com meio de cultura sólido De Man Rugosa Sharper (MRS) salinizado a 1,5% de NaCl e suplementado com 1% de azul de anilina. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas e posteriormente as colônias contabilizadas.

Após o crescimento bacteriano, as colônias foram identificadas quanto a sua morfologia, coloração de gram e produção de catalase. Apenas as colônias em formato de cocos ou bastonetes, coloração gram-positiva, catalase negativa com afinidade ao azul de anilina foram selecionadas e então isoladas. Para a determinação da curva de crescimento das bactérias ácido lácticas isoladas, as cepas foram inoculadas em caldo de meio MRS e crescidas em estufa a 35° por 24 horas. A cada duas horas uma alíquota de 1mL foi retirada para leitura em espectrofotômetro (630nm de absorbância). Em paralelo, placas petri com meio MRS ágar foram inoculadas com as bactérias em crescimento. Ao final os valores de absorbância foram convertidos em Unidades Formadoras de Colônia através de uma regressão exponencial. Com os dados finais foram estimadas equações de velocidade máxima e tempo de duplicação (RAMIREZ *et al.*, 2016) onde (Z) é a concentração final, (Z0) é concentração final e (dt) o tempo de cultivo em horas.

Para o teste de resistência à NaCl, pH e sais biliares, as cepas foram incubadas a 35°C durante 24 horas, utilizando tubos de ensaio contendo 10mL de MRS caldo com NaCl (0,0; 1,5; 3,0 e 4,5%), pH (2,4,5,7 e 9,5) e sal biliar (5% de p / v) em triplicata. As amostras de cada tubo foram analisadas em espectrofotômetro para determinar a porcentagem de redução da absorbância em comprimento de 630nm. Para os sais biliares, foi utilizado um controle (MRS caldo sem sais biliares 5% p/v) para comparar a redução. Foi também avaliada a capacidade antagônica das cepas frente a patógenos como *Aeromonas hydrophila* (CPQBA22808 DRM), *Aeromonas jandaei* (LAQUA), *Enterococcus duran* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Vibrio parahaemolyticus* (LAQUA), *Vibrio fluvialis* (LAQUA), *Shewanella putrefaciens* (LAQUA) e *Citrobacter freundii* (LAQUA),

fornecidas pelo laboratório de Camarão Marinho (Universidade Federal de Santa Catarina) e pelo Laboratório de Aquicultura na Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Para isso, as cepas com potencial probiótico previamente isoladas foram crescidas em caldo MRS a 35°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, estas foram inoculadas (100µL) em placas *petri* contendo meio de cultura MRS agar e novamente incubadas a 35°C por 48 horas. Finalizada a incubação, seis discos com diâmetro de 0,8cm foram seccionados de cada placa sendo 1 controle positivo (Oxytetraciclina 3mg/L) e alocados em novas placas petri contendo meio de cultura Triptona de soja Agar (TSA). Os patógenos descritos acima foram previamente inoculados nestas placas com meio de cultura TSA antes da alocação dos discos. Após incubação a 35° por 24 horas, foi o aferido o diâmetro dos halos de inibição (mm) das bactérias ácido lácticas frente aos patógenos.

Os resultados in vitro foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis e a comparação dos postos foi realizado pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). A identificação da bactéria selecionada foi realizada pela técnica de MALD-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) determinando o peso molecular das proteínas ribossomais (<500000 Dalton) com pulso de laser 260-337nm (KARAS *et al.*, 1987). Score com valores $\geq 1,7$ foram considerados para identificação em nível de gênero e espécie para bactérias gram-positivas (TEKIPPE *et al.*, 2012).

Resultados

Foram selecionadas 8 bactérias isoladas em MRS agar com diferentes arranjos morfológicos. Destas, apenas cinco foram escolhidas (CP01, CP02, CP03, CP04 e CP05) por apresentarem coloração gram-positiva, catalase negativa e afinidade com azul de anilina (Tabela 1).

Tabela 1. Aspectos bioquímicos e morfológicos das bactérias isoladas em MRS agar.

	I01	I02	I03	I04	I05	I06	I07	I08
Teste Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	+	-	-	-	-	-	-
A. anilina	+	-	+	+	+	+	-	-
Morfologia	BC	C	C	C	C	BC	C	B
Selecionada	CP01	NS	CP02	CP03	CP04	CP05	NS	NS

A. anilina=Azul de anilina, BC=Bacilo coccus, C=coccus, B=Bacilo, NS=Não selecionada.

As cepas CP1 e CP5 apresentaram as melhores taxas de velocidade máxima de crescimento ($p < 0,05$), e os menores valores para taxa de duplicação e maiores valores de células viáveis totais em unidades formadoras de colônias/mL (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da média e desvio padrão da cinética de crescimento bacteriano.

	CP01	CP02	CP03	CP04	CP05
VMC (cel/h ⁻¹)	1,16±0,03a	1,11±0,01b	0,89±0,01d	0,95±0,02c	1,16±0,01a
TD (cel/h ⁻¹)	0,58±0,02a	0,63±0,01b	0,77±0,01d	0,72±0,02c	0,60±0,01a
CVT*	22,04±6,12a	4,17±1,28b	0,39±0,41c	0,18±0,56c	14,11±7,54a

VMC- Velocidade máxima de crescimento; TD- Taxa de duplicação; CVT- Células Viáveis Totais em Unidades Formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹ x10⁸ cel-celulas.

Para os testes de resistência foi observado melhor resistência da cepa CP3 perante a atividade enzimática dos sais biliares (Tabela 2). Contudo, a cepa CP5 se mostrou mais resistente ($p < 0,05$) as variações de salinidade (NaCl) e variações de pH.

Tabela 3. Média e desvio padrão do percentual de redução dos testes de resistência.

Cepas	S. biliar	NaCl0%	NaCl3%	NaCl4.5%	pH2.5	pH5.0	pH9.0
CP01	21.07±1.69abc	43.40±4.37c	72.26±1.33ab	66.72±1.36 ^a	65.15±2.12ab	74.98±2.08b	94.74±2.09ab
CP02	15.74±1.76bc	54.36±2.52ab	55.06±2.08c	49.92±2.16ab	56.57±7.04b	70.24±3.79b	88.82±8.32b
CP03	27.47±3.82a	47.49±0.97bc	60.54±2.77abc	37.45±2.30ab	41.36±5.01c	92.56±1.92a	91.41±4.77ab
CP04	15.00±2.04c	55.54±2.06a	57.27±1.12bc	29.97±0.88b	39.30±5.54c	47.68±7.06c	94.74±2.11ab
CP05	24.47±1.73ab	52.24±1.96abc	76.30±2.91a	67.47±2.03a	74.17±5.36a	97.45±1.95a	98.44±1.02a

S. biliar= Sal biliar

Em relação a capacidade antagônica frente a bactérias patogênicas, os melhores resultados observados foram para o antibiótico tetraciclina. No entanto, a cepa CP5 apresentou alguns resultados estatisticamente semelhantes ao antibiótico perante ao *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas Jandaei*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Shewanella putrefaciens* (Tabela 3).

Tabela 4. Média e desvio padrão dos halos de inibição das cepas frente a patógenos.

	*V. fluvialis	V. parahem	A. hydrop	A. jandai	S. aureus	E. duran	E. coli	C. freund	S. putrefac
Antibiótico	17.54±0.05a	17.36±0.15a	17.42±0.13a	17.38±0.16a	18.00±0.25a	17.82±0.45a	17.80±0.64a	17.04±0.09a	17.22±0.18a
CP01	15.06±0.44abc	15.02±0.65ab	13.64±0.59b	15.68±0.28ab	14.88±0.35c	11.40±0.86c	15.68±0.51b	15.60±0.20abc	15.76±0.17ab
CP02	13.6±0.55c	14.56±0.78ab	14.40±0.89ab	14.40±42b	15.58±0.63c	12.06±0.49c	14.76±0.36bc	14.08±0.23bc	14.12±0.30b
CP03	16.08±0.75abc	16.26±0.71ab	16.04±1.05ab	16.10±1.24ab	17.28±0.68ab	13.86±0.63b	16.56±0.97ab	15.62±0.50abc	15.60±0.51ab
CP04	12.12±0.18c	11.82±0.78b	12.32±0.41b	13.14±0.26b	14.68±0.34c	11.06±0.68c	13.42±0.68c	13.96±0.29c	13.86±0.22b
CP05	16.50±0.91ab	16.38±1.56a	16.16±0.97ab	16.62±0.66ab	16.92±0.80b	14.22±0.72b	15.88±0.82ab	16.12±0.27ab	15.92±0.27ab

* *Vibrio fluvialis*; *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandai*, *Staphylococcus áureos*, *Enterococcus duran*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Shewanella putrefaciens*.

De acordo com os melhores resultados in vitro (testes de resistência e antagonismo) apresentados pela cepa CP5, esta foi selecionada como potencial probiótico e então identificada pela técnica de MALDI-TOF-MS como *Lactobacillus plantarum* DSM 2360 com escore de 2.01.

Discussão

O uso da bactéria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* vem sendo cada vez mais difundido na aquicultura nos últimos anos, reportando diversos benefícios aos seus hospedeiros (PICCOLO *et al.*, 2015; VAN DOAN *et al.*, 2016; ZAI *et al.*, 2017; JATOBA *et al.*, 2018). Uma de suas principais características é a eficiente capacidade de colonizar rapidamente o trato intestinal (JATOBA *et al.*, 2018). Esta capacidade está diretamente relacionada a velocidade de crescimento fator fundamental para uma bactéria com propósito probiótico (VINE *et al.*, 2004).

Contudo, apesar de seu rápido desenvolvimento, também é reportado na literatura que a ação dos sais biliares reduz seu crescimento. De acordo Balcázar *et al.* (2008) cepas de *Lactobacillus plantarum* isoladas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresentaram baixa viabilidade em presença de sais biliares (BALCÁZAR *et al.*, 2008). Essa redução de crescimento e menor viabilidade também foi observada para o presente estudo em condições in vitro.

Os sais biliares funcionam como emulsificante natural, responsável pela solubilidade de gorduras e vitaminas lipossolúveis. Estas propriedades atuam como um tipo de bactericida, afetando a parede celular destes microorganismos (LEHNINGER *et al.*, 2008). Apresentar resistência a este fator, bem como a acidez do estômago são características das bactérias ácido lácticas usadas como probióticos (SUCCI *et al.*, 2005). Os baixos níveis de pH do estômago são um dos principais obstáculos enfrentados por estas bactérias até chegar ao intestino, sendo este um teste in vitro indispensável (VIEIRA *et al.*, 2013; NA-KYOUNG *et al.*, 2015).

De acordo com Sung-Ho *et al.* (2017) a cepa *Lactobacillus plantarum* apresenta boa viabilidade em condições gástricas de pH ácido. Tal característica foi observada no presente estudo com níveis de pH 2,5 não afetando de forma acentuada seu crescimento e viabilidade e comparação com as outras cepas. Não apenas em meio ácido, mas também em níveis alcalinos de pH 9,0, os resultados para este estudo demonstraram viabilidade adequada comparadas as demais cepas. Esta capacidade de resistência a variação de pH é uma característica importante para um probiótico

aquícola, permitindo seu uso não apenas na dieta do hospedeiro, mas também diretamente na água como um possível biorremediador (MERRIFIELD *et al.*, 2010).

Dentre os principais parâmetros físico químicos da água, a salinidade também pode afetar a viabilidade das bactérias probióticas (VIEIRA *et al.*, 2013) principalmente para peixes marinhos devido ao seu específico mecanismo de osmoregulação realizado no intestino (MARSHALL & GROSELL, 2006; BALDISSEROTTO, 2007; WHITTAMORE, 2012). Contudo, algumas bactérias ácido lácticas apresentam boa viabilidade e resistência em diferentes níveis de salinidade (RICCIARD *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2013), como observado neste estudo para a cepa de *L. plantarum*.

Atendendo as premissas de resistência a fatores adversos como acidez, alcalinidade e atividades enzimáticas existentes no trato-gastrointestinal, a colonização do intestino por essa cepa probiótica torna-se amplamente possível. Com uma efetiva colonização, a inibição de patógenos torna-se mais fácil através da competição por espaço e nutrientes (JATOBÁ *et al.*, 2008; GATSOUPE *et al.*, 2008).

A habilidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas é uma característica importante e solicitada em um probiótico no ramo da aquicultura (ALY *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008; CORNÉLIO *et al.*, 2013). As bactérias ácido lácticas destacam-se neste cenário pela produção de componentes antimicrobianos responsáveis pela inibição de patógenos (BALCÁZAR *et al.*, 2008). De acordo com Vieira *et al.* (2013) a bactéria *Lactobacillus plantarum* apresenta uma ótima capacidade inibitória contra *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterococcus duran*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio alginolyticus*.

Para o presente estudo esta capacidade inibitória também foi observada, principalmente frente ao *Vibrio parahaemolyticus* apresentando resultados semelhantes ao antibiótico padrão tetraciclina. Tal habilidade pode ser explicada pela produção de ácido láctico, formação de peróxido de hidrogênio e de substância conhecida como “plantaricina” (HERNANDEZ *et al.*, 2005; SUGITA *et al.*, 2007). De acordo com Klaenhammer (1993), a bactéria em questão seria produtora da “plantaricina S”, bacteriocina específica extremamente eficiente contra bactérias gram negativas. De toda forma, todos estes componentes citados acima promovem a inibição de bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas, tornando a espécie *Lactobacillus plantarum* um potencial probiótico para aquicultura marinha.

Conclusão

A bactéria ácido láctica isolada e identificada como *Lactobacillus plantarum* apresentou boa viabilidade aos testes de resistência *in vitro*, bem como ampla

capacidade inibitória de patógenos. Desta forma, *L. plantarum* é recomendada como possível probiótico marinho para peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo apoio financeiro da FAPITEC e pela bolsa de produtividade ao Rodrigo Yudi Fujimoto (305195/2016-6).

Referencias

Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. 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 immunology*, 25(1-2), 128-136.

Blain Kennedy, S., Tucker Jr, J. W., Neidig, C. L., Vermeer, G. K., Cooper, V. R., Jarrell, J. L., & Sennett, D. G. (1998). Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 62(2), 573-588.

Bolívar Ramírez, N. C. (2016). Avaliação do uso de sais orgânicos em conjunto com probióticos no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

Cornélio, F. H. G., Cargnin-Ferreira, E., de Borba, M. R., Mouriño, J. L. P., Fernandes,

V. A. G., & Fracalossi, D. M. (2013). Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 863-870.

Hernandez, D., Cardell, E., & Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of applied microbiology*, 99(1), 77-84..

Jatobá, A., Pereira, M. O., Vieira, L. M., Bitencourt, M., Rodrigues, E., Fachini, F. A., & Moraes, A. V. (2018). Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(1), 327-332.

Johnston, G., Kaiser, H., Hecht, T., & Oellermann, L. (2003). Effect of ration size and feeding frequency on growth, size distribution and survival of juvenile clownfish, *Amphiprion percula*. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(1), 40-43.

Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20), 2299-2301.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.

Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U. (1996) Detection of pathogenic and nonpathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10(8):883–8.

Kumar, R., Mukherjee, S. C., Ranjan, R., & Nayak, S. K. (2008). Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish & shellfish immunology*, 24(2), 168-172.

Lee, N. K., Han, K. J., Son, S. H., Eom, S. J., Lee, S. K., & Paik, H. D. (2015). Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1036-1041.

Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horre, R., Maier, T., ... & Sahl, H. G. (2009). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2912-2917.

Marshall, W. S., & Grosell, M. (2006). Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. *The physiology of fishes*, 3, 177-230.

Piccolo, G., Bovera, F., Lombardi, P., Mastellone, V., Nizza, S., Di Meo, C., ... & Nizza, A. (2015). Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance and hematological traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture international*, 23(4), 1025-1032.

Pramod, P. K., Sajeevan, T. P., Ramachandran, A., Thampy, S., & Pai, S. S. (2010). Effects of two anesthetics on water quality during simulated transport of a tropical

ornamental fish, the Indian tiger barb *Puntius filamentosus*. *North American Journal of Aquaculture*, 72(4), 290-297.

Son, S. H., Jeon, H. L., Jeon, E. B., Lee, N. K., Park, Y. S., Kang, D. K., & Paik, H. D. (2017). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 181-186..

Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS microbiology letters*, 244(1), 129-137.

Sugita, H., Ohta, K., Kuruma, A., & Sagesaka, T. (2007). An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. *Aquaculture Research*, 38(9), 1002-1004.

TeKippe, E. M., Shuey, S., Winkler, D. W., Butler, M. A., & Burnham, C. A. D. (2013). Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms using the Bruker Biotyper MALDI-TOF MS system. *Journal of clinical microbiology*, JCM-02680.

Van Doan, H., Doolgindachbaporn, S., & Suksri, A. (2016). Effect of *Lactobacillus plantarum* and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) on growth performance, immunity and disease resistance of *Pangasius catfish* (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). *Aquaculture nutrition*, 22(2), 444-456.

Wesseling, W., Wittka, S., Kroll, S., Soltmann, C., Kegler, P., Kunzmann, A., ... & Lohmeyer, M. (2015). Functionalised ceramic spawning tiles with probiotic *Pseudoalteromonas* biofilms designed for clownfish aquaculture. *Aquaculture*, 446, 57-66.

Whittamore, J. M. (2012). Osmoregulation and epithelial water transport: lessons from the intestine of marine teleost fish. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(1), 1-39.

Zhai, Q., Wang, H., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2017). Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation decreases tissue lead accumulation and alleviates lead toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 48(9), 5094-5103.

CAPITULO 4

**Suplementação probiótica com *Lactobacillus plantarum*
autóctone no desempenho zootécnico e resistência sanitária
do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* em cativeiro**
**Autochthone *Lactobacillus plantarum* probiotic supplementation
on productive performance and sanitary resistance of clownfish
Amphiprion ocellaris in captivity**

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação probiótica com *Lactobacillus plantarum* na dieta do peixe palhaço. Para tanto, foi realizado um experimento em DIC com 4 tratamentos (T1= Controle sem probiótico, T2= 10^4 , T3= 10^6 e T4= 10^8 UFC/g de ração) e três repetições. Foram utilizados 120 animais ($0,46 \pm 0,01$ g e $0,26 \pm 0,06$ cm) alocados em aquários de 80L interligados a um sistema de recirculação de água, e estes foram alimentados três vezes ao dia (4% peso vivo). O experimento teve duração de 90 dias com biometrias mensais. Ao final de 90 dias nove peixes foram selecionados e o sangue foi retirado para análises hematológicas e outra amostras de peixes foram desafiados com injeção da bactéria patogênica *Vibrio fluvialis*. Com 30 e 60 dias de suplementação probiótica, foi observada melhor conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico, peso médio e biomassa nos peixes do T3 e T4. Aos 90 dias apenas o T3 apresentou melhor conversão alimentar aparente e taxa de crescimento específico. No sangue houve aumento de glicemia e proteína plasmática total no T4 bem como aumento dos valores eritrocitários (eritrócito, hematócrito e hemoglobina) e leucocitários (linfócito e neutrófilo). Após o desafio por *Vibrio fluvialis*, foi observada maior sobrevivência para o T4 (100%) seguido pelos tratamentos T3, T2 e T1 com 77%, 66% e 44% respectivamente. Conclui-se que a suplementação de *Lactobacillus plantarum* autóctone por 90 dias promovem melhor desempenho zootécnico e sobrevivência do peixe palhaço em cativeiro.

Palavra-chave: Ornamental, peixe palhaço, probiótico.

Abstract

The present study evaluated the probiotic dietary supplementation with *Lactobacillus plantarum* in the clown fish culture. For this, an experiment was performed with four treatments (T1 = Control without probiotic, T2 = 10^4 , T3 = 10^6 and T4 = 10^8 UFC / grams of feed) and three replicates. A total of 120 animals (0.46 ± 0.18 g and 0.26 ± 0.06 cm) were allocated in 80-liter aquaria connected to a water recirculation system.

The fish were fed three times a day and feed ratio of 4% by live weight. The period of experiment was of 90 days with monthly biometric analysis. At 90 days, a fish sample were used to hematological analysis and another sample were submitted to a challenge by *Vibrio fluvialis* injection. The fish supplemented in T3 and T4 showed better apparent feed conversion, specific growth rate, average weight and biomass at 30 and 60 days of experiment. At 90 days, only T4 presented better results of apparent feed conversion, specific growth rate. Increased glycemia and plasma protein were observed in fish from T4 also increases erythrocytes, hematocrit, hemoglobin and leukocytes (lymphocytes and neutrophils). After bacterial challenge, it was higher survival rate in fish from T4 (100%) followed by T3, T2 and T1 with 77%, 66% and 44% respectively. It is concluded that the dietary supplementation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* for clownfish in captivity by 90 days promotes better zootechnical performance and the resistance to bacterial challenge.

Keywords: Ornamental, Clownfish, probiotic.

Introdução

A indústria de peixe ornamental ao redor do mundo apresentou um valor estimado em 15 bilhões de dólares no ano de 2011. Neste cenário bilionário, a piscicultura ornamental marinha tem um destaque especial pelo alto valor de mercado das espécies. Entre as espécies ornamentais marinhas mais comercializadas ao redor do mundo, os peixes recifais são as principais espécies negociadas (RHYNE *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2012; LADISA *et al.*, 2017).

Dentre as espécies de recife de coral comercializadas como peixe ornamental marinho, a espécie *Amphiprion ocellaris* comumente conhecida como peixe palhaço ou falso palhaço. Esta espécie é o carro chefe do mercado aquarista marinho se destacando entre as 5 espécies mais comercializadas no mundo, sendo produzida em cativeiro em dez países incluindo o Brasil (FAO, 2010; RHYNE *et al.*, 2017).

No entanto, devido a esta intensificação de cultivo problemas com enfermidades tornaram-se cada vez mais comuns. As infecções por bactérias são as principais causas de surtos de mortalidades em peixes ornamentais marinhos em especial às ocasionadas por *Vibrios* spp. (FIORAVANTI & FLORIO, 2017). Como forma de controlar essas doenças, produtores usam erroneamente antibióticos promovendo a seleção de bactérias mais resistentes (GASTALHO *et al.*, 2014).

Como alternativa ambientalmente mais adequada ao uso de antibióticos, o probiótico vem se destacando ao longo dos anos na aquicultura. Probiótico é definido atualmente como microorganismos vivos viáveis que quando suplementados na dieta promovem benefícios ao hospedeiro (SAYES *et al.*, 2018). Já foi reportado o uso em

peixes de algumas bactérias ácido lácticas probióticas como *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* (MERRIFIELD *et al.*, 2010b; JATOBÁ *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018). Sendo que bactérias autóctones, ou seja, isoladas da própria espécie promovem melhores respostas dos hospedeiros quando comparado a probióticos alóctones (JATOBA *et al.*, 2018; HARU *et al.*, 2017)

O uso de bactérias ácido lácticas como probiótico mostraram-se bem eficientes em promover benefícios ao hospedeiro como melhora do desempenho zootécnico, melhora do sistema imunológico e uma maior resistência a bactérias patogênicas (MEHISAN *et al.*, 2015; NANDI *et al.*, 2017). Por isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a suplementação probiótica com *Lactobacillus plantarum* na dieta do peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* criado em cativeiro.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo Laboratório de Aquicultura de acordo com os padrões éticos de experimentação animal (CEUA nº 010218). O probiótico foi previamente isolado de seis peixes palhaço com aspecto saudável, testado *in vitro* e posteriormente identificado pela técnica de MALDI TOF como *Lactobacillus plantarum* (DSM 2360 2.01 Score) (KARAS *et al.*, 1987). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos de suplementação probiótica (**T1** = Controle, **T2** = 10^4 , **T3** = 10^6 e **T4** = 10^8 UFC/g de ração) e três repetições. A bactéria probiótica foi inoculada em caldo MRS salinizado (NaCl 1,5%) e crescida em estufa a 35°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, a suspensão foi submetida a diluição seriada determinando as concentrações de cada tratamento e posteriormente foram aspergidas na ração. A ração foi colocada em estufa para secagem a 35°C por 48 horas antes do fornecimento aos animais. A ração utilizada foi específica para peixes ornamentais marinhos (Tetra Marine Granules – Proteína Bruta 44%; Extrato Etéreo 11%; Fibra 2%; Minerais 9%; enriquecida com Vitamina C e ácidos graxos Ômega-3).

Foram utilizados cento e vinte (120) peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* com peso médio $0,46 \pm 0,01$ g e $0,26 \pm 0,06$ cm adquiridos de piscicultura comercial. Os animais foram aclimatados e alocados em aquários de vidro (capacidade para 80 litros) interligados a um sistema de recirculação de água com densidade de 10 peixes por aquário (KODAMA *et al.*, 2011). A taxa e frequência alimentar foram definidas em 4% peso vivo e alimentação 3 vezes ao dia (9, 12 e 17 horas) de acordo com (JOHNSTON *et al.*, 2003). Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se estáveis como salinidade $30,00 \pm 0,48$ ppt, temperatura $28,07 \pm 0,54$ C°, pH $8,16 \pm 0,06$, $6,48 \pm 0,36$ e amônia total $0,29 \pm 0,10$ mg/L.

O experimento teve um total de 90 dias com biometrias mensais (30, 60 e 90 dias) aferindo peso e comprimentos (comprimento total, comprimento padrão, altura dorso peitoral). Para tanto, os animais foram previamente anestesiados por imersão em solução de benzocaina 20mg/Litro (PRAMOD *et al.*, 2010). Foram então determinados os parâmetros de ganho de comprimento total (GPT= Comprimento total final – comprimento total inicial), ganho de comprimento padrão (GPP= Comprimento padrão final – comprimento padrão inicial), ganho em altura (ALT= Altura final – altura inicial) ganho de peso (GP= Peso final – peso inicial), ganho de biomassa (GB= Biomassa final – biomassa inicial), taxa de crescimento específico (TCE= \ln peso final – \ln peso inicial / dias de experimento x 100), conversão alimentar aparente (CAA= Consumo de ração / Ganho de peso), consumo de ração (CR= Peso inicial da ração – Peso final da ração), fator de condição relativo (KR= \ln do peso final / b x \ln comprimento final – a), sobrevivência (S= Número de peixes final / número de peixes inicial x 100) e uniformidade (U Peixes dentro dos $\pm 20\%$ do peso médio / total de peixes x 100).

Ao final de 90 dias, nove peixes de cada tratamento foram utilizados para análise hematológica. Com auxílio de seringas esterilizadas e umedecidas com anticoagulante (EDTA 3%), 1mL de sangue foi coletado de cada animal via punção caudal e armazenado em eppendorf umedecidos com mesmo anticoagulante para posterior análise. O número total de eritrócitos (Cel x $10^6 \mu\text{L}^{-1}$) foi estimado com contagem em câmara de Neubauer (GARCIA-NAVARRO, 2005) e a porcentagem de hematócrito pelo método de micro hematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971). As concentrações de hemoglobina (g.dL⁻¹), glicose (mg.dL⁻¹) e proteína plasmática total (g.dL⁻¹) foram estimadas com auxílio dos aparelhos analisador bioquímico, Prestige IQ 50 e refratômetro (Quimis®) respectivamente. Os índices hematimétricos foram calculados segundo metodologia de Vallada (1999) para volume corpuscular médio (VCM= $\text{Ht} \times 100 / \text{Eri fL}$), hemoglobina corpuscular média (HCM= $\text{Hg} \times 10 / \text{Eri} \mu\text{g}$) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM= $\text{HCM} \times 100 / \text{Ht} \%$). Para a contagem diferencial de leucócitos totais foram feitas extensões sanguíneas segundo metodologia de Ranzani-paiva (1995) e então coradas segundo metodologia de Rosenfeld (1947) para análise em microscópio estimando a relação de 200 leucócitos para 2000 eritrócitos.

Ao final dos 90 dias também foi realizado um desafio experimental com injeção intraperitoneal com bactéria patogênica. Essa bactéria foi previamente isolada de palhaços doentes com sinais de bacteriose (Peixes doentes doados de fazenda aquícola em Recife) e identificada pela técnica de MALDI TOF (Karas *et al.*, 1987) como *Vibrio fluvialis*. Um delineamento inteiramente casualizado foi conduzido com

quarenta e cinco (45) peixes palhaços advindos do experimento anterior, sendo então divididos em cinco tratamentos e três repetições como se segue: Peixes sem suplementação probiótica injetados com Solução Salina (Controle negativo); peixes sem probiótico, mas desafiados com bactéria patogênica (controle positivo), e peixes suplementados com 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/g e então desafiados com a bactéria patogênica). Os animais foram alocados em tanques de 10 litros com aeração constante em densidade de 1 peixe para cada dois litros. Em seguida foram aplicadas injeções intraperitoneais em proporção de 1mL/100g de *Vibrio fluvialis* na concentração de 1×10^5 UFC/mL (MARUDHUPANDI *et al.*, 2017). Após aplicação do patógeno, foram observados sinais clínicos a cada duas horas durante um período de noventa e seis (96) horas. Ao final do experimento foi determinada a sobrevivência de cada tratamento e os animais restantes foram anestesiados para coleta de sangue e eutanasiados para análise microbiológica e verificação do postulado de Koch.

Os valores de desempenho zootécnico e parâmetros hematológicos foram avaliados de acordo com as premissas de normalidade e homocedasticidade por Shapiro Wilk e Bartlett respectivamente e então submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Os valores de sobrevivência em porcentagem foram transformados em arco seno raiz e então submetidos a estatística não paramétrica de Kruskal Wallis post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Resultados

Foi observado diferença estatística ($p < 0,05$) nos primeiros 30 dias para o tratamento 4 (T4) promovendo maior ganho de peso médio, ganho de biomassa e taxa de crescimento específico. Para os parâmetros de conversão alimentar aparente, comprimento total e comprimento padrão, T3 e T4 apresentaram semelhança estatística apresentando melhores resultados em relação aos demais tratamentos. O ganho em altura dos animais foi maior nos animais suplementados com probiótico (T2, T3 e T4) em relação ao controle (T1). A sobrevivência e fator de condição relativo não apresentaram diferença estatística (Tabela 1).

Tabela 1. Desempenho zootécnico (média \pm desvio padrão) do *Amphiprion ocellaris* com 30 dias de suplementação probiótica por *Lactobacillus plantarum*.

Parâmetros	T1	T2	T3	T4
GPM	96,67 \pm 29,63b	133,33 \pm 21,25ab	144,00 \pm 35,59ab	161,67 \pm 17,44a
GBM	967 \pm 296b	1333 \pm 212ab	1440 \pm 356ab	1617 \pm 174a
GCT	28,82 \pm 0,49b	30,16 \pm 0,34a	30,60 \pm 0,57a	31,43 \pm 0,89a

GCP	25,46±0,31b	25,92±0,30ab	27,93±2,46a	27,30±0,54a
GAT	11,27±0,31b	11,49±0,22a	11,54±0,21a	11,89±0,10a
CAA	6,75±1,77b	4,64±0,74ab	4,60±0,94a	3,76±0,44a
TCE	0,63±0,17b	0,84±0,12ab	0,90±0,19ab	1,00±0,10a
UNI	80,0±0,00a	56,67±5,77b	80,0±0,00a	56,67±5,77b
Kr	1,00±0,01a	1,00±0,00a	1,00±0,01a	1,00±0,01a
S	96,67±5,77a	100,00±0,00a	100,00±0,00a	100,00±0,00a

GPM=Ganho de peso médio, GBM=Ganho de biomassa, GCT=Ganho de comprimento Total, GCP=Ganho de comprimento padrão, GAT=Ganho em altura, CAA=Conversão alimentar aparente, TCE=Taxa de crescimento específico, UNI=Uniformidade, Kr=Fator de condição relativo, S=Sobrevivência.

No segundo mês de experimento foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) nos peixes suplementados com probióticos (T2, T3 e T4) em relação ao controle (T1) promovendo maior ganho de peso médio, ganho de biomassa e melhor conversão alimentar aparente. O tratamento 4 apresentou a maior taxa de crescimento em relação ao demais tratamentos. O fator de condição relativo e sobrevivência não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho zootécnico (média ± desvio padrão) do *Amphiprion ocellaris* com 60 dias de suplementação probiótica por *Lactobacillus plantarum*.

Parâmetros	T1	T2	T3	T4
GPM	289,86±77,45b	419,02±25,02a	380,37±38,59a	421,45±22,78a
GBM	2412±1143b	3594±330a	3803±385a	3957±473a
GCT	32,45±0,48c	36,57±0,39a	34,98±0,30b	35,73±0,49ab
GCP	28,44±1,02b	31,41±0,39a	31,17±0,60a	31,75±0,67a
GAT	12,72±0,57b	13,81±0,30ab	13,18±0,63ab	14,25±0,55a
CAA	8,27±1,83b	4,45±0,30a	4,27±0,29a	4,15±0,38a
TCE	1,58±0,31b	2,14±0,09ab	2,03±0,13ab	2,15±0,09a
UNI	56,67±20,82a	68,00±19,08a	76,67±20,82a	51,00±33,81a
Kr	1,00±0,01a	1,00±0,00a	1,00±0,01a	1,00±0,01a
S	93,33±11,55a	93,33±5,77a	100,0±0,00a	96,67±5,77a

GPM=Ganho de peso médio, GBM=Ganho de biomassa, GCT=Ganho de comprimento Total, GCP=Ganho de comprimento padrão, GAT=Ganho em altura, CAA=Conversão alimentar aparente, TCE=Taxa de crescimento específico, UNI=Uniformidade, Kr=Fator de condição relativo, S=Sobrevivência.

Ao final do experimento (90 dias) o T3 (10^6 UFC/g) apresentou maior ganho de peso médio, ganho de biomassa, taxa de crescimento específico e melhor conversão alimentar ($p < 0,05$). Para o T4 houve diferença estatística apenas para uniformidade. Os demais parâmetros de desempenho zootécnico não diferiram estatisticamente.

Tabela 3. Desempenho zootécnico (média \pm desvio padrão) do *Amphiprion ocellaris* com 90 dias de suplementação probiótica por *Lactobacillus plantarum*.

Parâmetros	T1	T2	T3	T4
GPM	460,76 \pm 23,74b	541,92 \pm 23,59ab	564,86 \pm 59,85a	563,56 \pm 127,57a
GBM	2180 \pm 1141b	3101 \pm 1425b	4604 \pm 820a	3519 \pm 838ab
GCT	37,24 \pm 0,91a	36,87 \pm 0,30a	36,94 \pm 1,07a	37,32 \pm 1,59a
GCP	31,76 \pm 1,04a	31,45 \pm 0,73a	31,37 \pm 0,80a	31,26 \pm 0,83a
GAT	13,88 \pm 0,10a	14,00 \pm 0,17a	14,32 \pm 0,31a	14,02 \pm 1,01a
CAA	8,50 \pm 3,52b	6,91 \pm 2,91b	3,81 \pm 0,53a	4,71 \pm 0,94b
TCE	2,14 \pm 0,10b	2,58 \pm 0,08ab	2,67 \pm 0,17a	2,62 \pm 0,41ab
UNI	34,29 \pm 1017b	36,53 \pm 15,90ab	58,13 \pm 15,63ab	66,47 \pm 24,10a
Kr	1,00 \pm 0,01a	1,00 \pm 0,01a	1,00 \pm 0,01a	1,00 \pm 0,01a
S	73,33 \pm 20,55a	76,67 \pm 12,47a	90,0 \pm 8,16a	80,0 \pm 8,16a

GPM=Ganho de peso médio, GBM=Ganho de biomassa, GCT=Ganho de comprimento Total, GCP=Ganho de comprimento padrão, GAT=Ganho em altura, CAA=Conversão alimentar aparente, TCE=Taxa de crescimento específico, UNI=Uniformidade, Kr=Fator de condição relativo, S=Sobrevivência.

As contagens de bactérias ácido lácticas no intestino refletiram as quantidades de probióticos inseridos nas dietas (tabela 4). Porém, no tratamento 4 houve uma menor quantidade de bactérias no intestino em relação ao que foi adicionado na ração. Para o tratamento 1 (Controle) não foi observada a presença de bactérias probiótica.

Tabela 4. Contagem de bactérias totais viáveis com 90 dias de suplementação probiótica por *Lactobacillus plantarum*.

Local/Tipo	T1	T2	T3	T4
Colonização da ração (UFC g⁻¹)				
Ração	0,00 \pm 0,00	2,64 \pm 1,53x10 ⁴	3,34 \pm 1,15x10 ⁶	2,33 \pm 0,58x10 ⁸
Colonização intestinal (UFC cm⁻¹)				
<i>L. plantarum</i> *	0,00 \pm 0,00x10 ⁰	2,33 \pm 0,53x10 ⁴	2,38 \pm 0,78x10 ⁶	1,34 \pm 0,51x10 ⁷
HT*	5,36 \pm 0,91x10 ⁷	4,23 \pm 0,10x10 ⁷	1,58 \pm 0,33x10 ⁷	1,14 \pm 0,45x10 ⁷

*Heterotróficas totais

Ao final de 90 dias de suplementação de probiótica houve um aumento da glicemia em todos os tratamentos com probiótico (T2, T3 e T4) em relação ao controle (T1) ($p < 0,05$). Para T4, a proteína plasmática, hematócrito e eritrócito foram estatisticamente maiores em relação aos valores dos outros tratamentos. O índice hematimétrico VCM, bem como o valor de hemoglobina foram maiores estatisticamente para o tratamento 3 (Tabela 5).

Tabela 5. Valores bioquímicos e eritrocitários (média \pm desvio padrão) do *Amphiprion ocellaris* com 90 dias de suplementação probiótica por *Lactobacillus plantarum*.

Parâmetros	T1	T2	T3	T4
Glic mg/dL	24,11 \pm 5,11b	39,00 \pm 2,60a	41,71 \pm 2,81a	44,33 \pm 8,03a
PPT (g/dL)	2,60 \pm 1,30c	8,00 \pm 2,00bc	10,73 \pm 0,89b	10,07 \pm 2,25a
Hemat (%)	12,84 \pm 0,95c	15,07 \pm 0,81bc	16,81 \pm 1,17ab	18,03 \pm 0,65a
Eri ($\times 10^6$)	1,00 \pm 0,42b	1,69 \pm 0,29ab	1,68 \pm 0,54ab	2,00 \pm 0,17a
Hemoglobina*	6,42 \pm 1,30b	8,00 \pm 2,00ab	10,73 \pm 0,79a	10,07 \pm 2,25ab
VCM(fL)	102,76 \pm 6,75ab	90,89 \pm 11,66ab	107,40 \pm 28,39a	87,83 \pm 6,79b
HCM %	64,92 \pm 28,27a	47,79 \pm 20,66a	76,06 \pm 23,00a	50,34 \pm 12,55a
CHCM %	52,07 \pm 13,13a	51,29 \pm 14,60a	66,17 \pm 4,52a	55,13 \pm 11,88a

Glic=Glicemia, PPT=Proteína Plasmática Total, Hemat=Hematócrito, Eri=Eritrócito, VCM=Volume Corpuscular Médio, HCM=Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM=Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, * g/dL

Para a contagem de células brancas foi observada diferença estatística no T4 em relação aos demais tratamentos com os peixes apresentando trombocitose e neutrofilia (Tabela 6). Semelhanças entre os T3 e T4 foram observadas para leucócitos totais em relação aos demais tratamentos, porém observou-se uma redução dos linfócitos nestes mesmos tratamentos. O T1 apresentou os menores valores dentre todos em relação a quantidade de monócitos.

Tabela 6. Valores médios \pm desvio padrão da contagem de células brancas em peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* suplementado com probiótico por 90 dias.

Parâmetros	T1	T2	T3	T4
Trombócito	1,11 \pm 0,14b	1,10 \pm 0,17b	1,20 \pm 0,20b	2,71 \pm 0,10a
Linfócito	16,90 \pm 1,28a	16,50 \pm 1,05ab	14,90 \pm 1,21b	13,30 \pm 1,33b
Monócito	0,50 \pm 0,08b	0,94 \pm 0,19 ^a	0,91 \pm 0,24a	1,11 \pm 0,25a
Neutrófilo	2,01 \pm 0,39c	2,02 \pm 0,67c	3,20 \pm 0,22b	4,95 \pm 0,41a

Basófilo	0,65±0,05a	0,50±0,04 ^a	0,64±0,07a	0,69±0,17a
Leucócitos totais	34,07±2,44ab	28,07±1,06b	45,24±5,98a	49,65±7,09a

*Leucócitos (células/ $\mu\text{L} \times 10^4$).

Essa diferença hematológica também refletiu em taxas de sobrevivências diferentes após o desafio experimental. Houve maior sobrevivência ($p < 0,05$) dos peixes no tratamento 4 em relação aos demais com sobrevivência de 100% após as 96 horas de infecção experimental por injeção de 1×10^5 UFC/mL *Vibrio fluvialis*. Contudo, para o T1 (Controle) a sobrevivência atingiu apenas 45% (Figura 1). Os peixes do controle negativo, sem suplementação e injetados com solução salina, apresentaram 100% de sobrevivência.

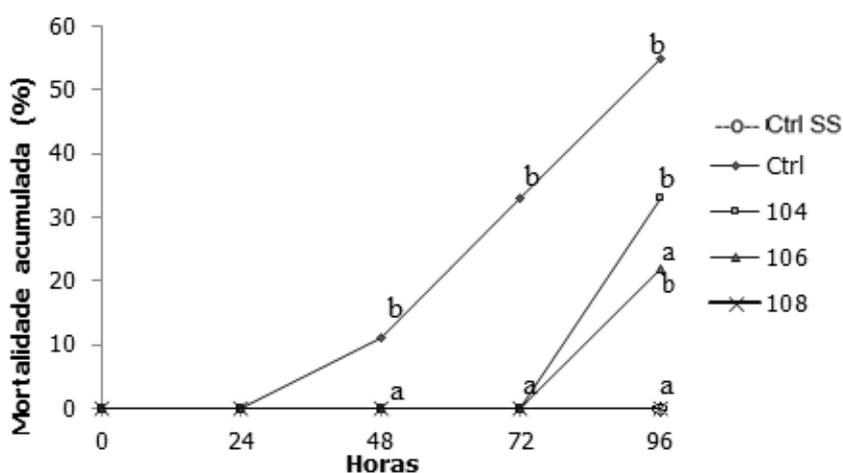


Figura 1. Morte acumulada ao longo de 96 horas de desafio por injeção intraperitoneal com patógeno marinho *Vibrio fluvialis*. Ctrl=Controle; Ctrl SS= Controle com injeção de Solução Salina.

Os primeiros sinais clínicos foram observados com 24 horas de infecção para o tratamento controle. A natação errática e hiperemia craniana foram os principais sintomas observados do início ao final do desafio para todos os peixes (Tabela 7). Os animais com estes sinais clínicos mantiveram o corpo sempre inclinado com a cabeça voltada para cima durante a natação.

Tabela 7. Sinais clínicos dos peixes desafiados por *Vibrio fluvialis* (96 horas).

Sinais Clínicos	Ctrl SS	T1	T2	T3	T4
Natação errática	-	+	+	+	-
Despigmentação epidérmica	-	+	+	-	-
Hemorragia cefálica	-	+	-	-	-
Hiperemia craniana	-	+	+	+	-
Perda de equilíbrio	-	+	-	-	-
Batimento opercular acelerado	-	+	-	-	-

Letargia	-	+	-	-	-
Hipertrofia do fígado	-	+	+	-	-
Hipertrofia do rim	-	+	-	-	-
Opacidade do fígado	-	+	-	-	-
Exsudado abdominal	-	+	-	-	-
Hemorragia interna	-	+	-	-	-

Ctrl=Controle, Ctrl SS=Controle Solução Salina.

Na região da cabeça, entre os olhos, manchas avermelhadas tornaram-se visíveis durante o experimento (entre 36 e 96 horas) sendo observado sinais hemorrágicos (b) em alguns peixes mais debilitados, despigmentação epidérmica (c) e quando em óbito apresentavam hipertrofia do fígado (a) (Figura 2). Os demais sinais clínicos foram observados apenas no grupo controle injetado com patógeno.



Figura 2. Sinais clínicos externos e internos de peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* desafiados por bactéria patogênica marinha *Vibrio fluvialis*. Os peixes da figura (a) e figura (b) foram retirados do controle injetado com patógeno. Para a figura (c) foi ilustrado 1 peixe do controle com solução salina estéril injetada e 1 peixe do controle injetado patógeno para comparação da pigmentação.

O perfil hematológico dos peixes ao final do desafio (96 horas) mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 8). Os palhaços do controle positivo (peixes sem suplementação e desafiados) apresentaram elevação de glicemia e lactato. No entanto para o mesmo tratamento foi observada a redução de eritrócitos e das células de defesa como trombócito, linfócito, neutrófilo e basófilo. Apenas o monócito apresentou valores mais elevados. Para o tratamento 10^8 UFC.g⁻¹ (T4) valores estatisticamente maiores foram para neutrófilos, basófilos e trombócitos.

Tabela 8. Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) dos peixes palhaço *Amphiprion ocellaris* desafiados por patógeno marinho *Vibrio fluvialis*.

	Ctrl SS	T1	T2	T3	T4
Glicemia*	12,60±2,41b	41,20±16,36a	26,40±7,16a	18,20±6,34ab	18,00±3,74ab
Lactato*	0,90±0,13c	2,28±0,12a	1,43±0,14b	0,98±0,13c	0,90±0,15c
Eritrócito	0,82±0,49ab	0,38±0,23c	0,60±0,22b	1,02±0,49a	1,10±0,35a
Trombócito	0,21±0,01ab	0,05±0,01b	0,18±0,05ab	0,48±0,02ab	0,80±0,11a
Linfócito	2,15±0,04ab	1,28±0,02b	2,02±0,13ab	3,67±0,02a	3,95±0,14a
Monócito	0,20±0,01ab	0,34±0,02a	0,34±0,01a	0,18±0,02b	0,20±0,02ab
Neutrófilo	0,25±0,04ab	0,09±0,01b	0,22±0,02ab	0,59±0,04ab	1,01±0,11a
Basófilo	0,15±0,02b	0,05±0,01d	0,08±0,01c	0,20±0,01b	0,30±0,04a
Leucócitos totais	13,9±0,48a	11,81±0,12b	13,73±0,29a	12,58±0,12ab	13,16±0,47ab

Trombócito (células/ $\mu\text{L} \times 10^3$), Leucócitos (células/ $\mu\text{L} \times 10^4$) Eritrócito (células/ $\mu\text{L} \times 10^6$), *grama/dL, Ctrl=Controle, Ctrl SS=Controle solução salina.

Discussão

O presente estudo foi o primeiro relato de isolamento e uso *in vivo* de bactérias probióticas autóctones para a espécie de peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*. A seleção de bactérias autóctones mostra-se mais eficiente em colonizar o trato intestinal do hospedeiro e promover seus benefícios (JATOBÁ *et al.*, 2018; HURA *et al.*, 2018). Um dos principais benefícios observados nos peixes é o ganho de desempenho zootécnico atribuído ao tempo de suplementação probiótica, como observado no tratamento 4 (10^8 UFC. g^{-1}).

De acordo com Dias *et al.* (2018), tambaquis *Colossoma macropomum* alimentados com dieta probiótica autóctone durante 120 dias, apresentaram maior ganho de peso e taxa de crescimento específico. Para tilápia *Oreochromis niloticus* alimentadas com *Bacillus licheniformis* com apenas 30 dias também foi observado maior ganho de peso e taxa de crescimento específico (GOBI *et al.*, 2018). Esse aumento em desempenho para peso e comprimento foi observado também para o presente estudo com *Lactobacillus plantarum* autóctone na dieta do peixe palhaço.

Esse melhor desempenho produtivo do animal pode ser explicado pela colonização do trato intestinal do hospedeiro pelas bactérias probióticas que promovem a modulação da microbiota existente auxiliando na digestão (SAYES *et al.*, 2018). Essa melhor digestão pode estar ligada ao aumento das vilosidades intestinais reportada na literatura como resultado da suplementação probiótica (MUNIR *et al.*, 2018). Resultados contrários são observados com o uso de probiótico comercial

Lactobacillus helveticus CD6 para kinguios *Carassius auratus* não promovendo aumento do desempenho (AHIRE *et al.*, 2018), mostrando a importância de um probiótico autóctone com maior capacidade de colonizar o intestino e promover os benefícios.

O sistema imunológico do animal também é totalmente beneficiado com a suplementação probiótica (GAO *et al.*, 2018). Os maiores valores de glicemia no sangue no presente estudo para os tratamentos com probiótico podem ser atribuídos a maiores absorções de nutrientes das dietas por estes animais (MUNIR *et al.*, 2018). Este aumento de glicemia no sangue também é reportado por Dias *et al.* (2018) com o uso de *Bacillus cereus* como probiótico. Células eritrocitárias assim como hematócrito, hemoglobina também apresentaram um aumento com a suplementação probiótica no presente estudo. Para *Carpas Cyprinus* carpio alimentadas com *Lactobacillus plantarum* resultados similares foram reportados com aumento de células vermelhas e hematócrito e hemoglobina (VALIALLAHI *et al.*, 2018).

O perfil hematológico dos animais oferece informações importantes sobre seu estado de saúde e aspectos nutricionais (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2014). A suplementação probiótica expressa essa relação claramente entre o perfil nutricional do hospedeiro e a melhora em saúde (SAYES *et al.*, 2018). O aumento de células de defesa como linfócito e neutrófilo observado neste estudo, também é observado na literatura para *Labea rohita* alimentadas com *Bacillus* sp. (NANDI *et al.*, 2017). O neutrófilo é considerado a primeira célula de defesa do animal relacionada a processos inflamatórios (YAMASHITA *et al.*, 2017). Esse aumento de neutrófilos no sangue circulante do peixe palhaço mostra um efeito imunoestimulantes promovido pela suplementação probiótica.

Atribuído ao estímulo imunológico, a resistência a infecção por bactéria patogênica é amplamente observada na literatura em peixes suplementados com probióticos. Tilápias *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta probiótica *Bacillus licheniformis* apresentaram melhora imunológica e maior resistência a infecção por *Aeromonas hydrophila* (GOBI *et al.*, 2018). Para kinguios alimentados com *Bacillus velezensis* a melhora imunológica também promoveu maior resistência a infecções por *Aeromonas hydrophila* (YANGLEI *et al.*, 2018).

Para este estudo, os peixes palhaço alimentados com 10^8 UFC. g⁻¹ de *Lactobacillus plantarum* apresentaram maior resistência a infecção por 1×10^5 UFC/mL de *Vibrio fluvialis*. Concentração semelhante foi observada com *Vibrio parahaemolyticus* em *Amphiprion sebae*, sendo 1×10^5 UFC/mL a concentração capaz de matar 50% dos peixes (MARUDHUPANDI *et al.*, 2017). A bactéria *Vibrio fluvialis* já foi reportada como patógeno para peixe ornamental marinho (SONIA & LIPTON, 2012)

sendo este o primeiro relato para a espécie de peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*. Essa espécie pode causar celulite hemorrágica e inflamação cerebral (HUANG & HSU, 2005), sinais clínicos estes observados no presente estudo durante o desafio experimental, explicando assim a redução de eritrócitos devido a um processo hemorrágico nos animais.

Apesar da melhora imunológica e maior resistência a infecção por *V. fluvialis* observada para os palhaços com maior suplementação probiótica, a concentração de 10^8 UFC. g⁻¹ não apresentou isoladamente o melhor resultado para desempenho zootécnico. Este fator pode ser atribuído a quantidade de bactérias que colonizaram o intestino. Sendo que na maior concentração administrada na ração houve uma redução da carga bacteriana logarítmica no intestino no tratamento T4 (tabela 4). De acordo com Liu *et al.* (2018) o aumento da concentração probiótica promoveu uma melhora imunológica e maior resistência a infecção por *Vibrio alginolyticus* para o peixe ornamental marinho Ishidai *Oplegnathus fasciatus*, porém não observou melhora no desempenho zootécnico como observado no presente estudo na maior concentração talvez relacionado a alguma limitação física na quantidade de bactérias que podem colonizar o intestinal. Por este motivo é essencial determinar concentrações ideais de suplementação probiótica para o cultivo promovendo o melhor custo-benefício possível.

Conclusão

A bactéria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* mostrou-se eficiente como probiótico para peixe palhaço *Amphiprion ocellaris* promovendo melhor desempenho zootécnico na concentração 10^6 UFC/g de ração. A concentração 10^8 UFC/g de ração apresentou melhor modulação imunológica promovendo uma maior resistência dos peixes desafiados por *Vibrio fluvialis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo apoio financeiro da FAPITEC e pela bolsa de produtividade ao Rodrigo Yudi Fujimoto (305195/2016-6).

Referencias

Ahire, J. J., Mokashe, N. U., & Chaudhari, B. L. (2018). Effect of Dietary Probiotic *Lactobacillus helveticus* on Growth Performance, Antioxidant Levels, and Absorption of Essential Trace Elements in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-10.

Annie Selva Sonia, G., & Lipton, A. P. (2012). Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from the captive-reared tropical marine ornamental blue damselfish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41(4), 348-354.

Fioravanti, M. L.; Florio, D. (2017). Common Diseases in Marine Ornamental Fishes. *Marine Ornamental Species Aquaculture*, p. 347-380.

Gao, X., Zhang, M., Li, X., Han, Y., Wu, F., & Liu, Y. (2018). The effects of feeding *Lactobacillus pentosus* on growth, immunity, and disease resistance in *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish & shellfish immunology*, 78, 42-51.

Gastalho, S., Silva, G., & Ramos, F. (2014). Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 3(1), 29-45..

Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K. B., & Badiola, I. (2014). *Bacillus cereus* var:toyol promotes growth, affects the histological organization and microbiota of intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91, 2766-2774. Retrieved from <http://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts /91/6/2766>

Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J. C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M., & Iswarya, A. (2018). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*, 74, 501-508.

Huang, K. C., & Wen-Wei Hsu, R. (2005). *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitis and cerebritis. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 75-77.

Hura, M. U. D., Zafar, T., Borana, K., Prasad, J. R., & Iqbal, J. (2018). Effect of commercial probiotic bacillus megaterium on water quality in composite culture of major carps.

Jatobá, A., Moraes, K. N., Rodrigues, E. F., Vieira, L. M., & Pereira, M. O. (2018). Frequency in the supply of *Lactobacillus* influence its probiotic effect for yellow tail lambari. *Ciência Rural*, 48(10).

Ladisa, C., Bruni, M., & Lovatelli, A. (2017). Overview of ornamental species aquaculture. *FAO Aquaculture Newsletter*, (56), 39.

Liu, C. H., Wu, K., Chu, T. W., & Wu, T. M. (2018). Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture International*, 26(1), 63-74.

Magnadóttir, B., (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151.

Mehisan, M. S., El-Moghazy, G. M., El-Sayed, A. E. K. I., Iraqi, M. M., & Soltan, M. A. (2015). Role of Probiotics in Improving Growth Performance, Immunity and Controlling *Aeromonas Hydrophila* in the Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 287(2395), 1-16.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Baker, R. T. M., & Davies, S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture nutrition*, 16(5), 496-503.

Munir, M. B., Marsh, T. L., Blaud, A., Hashim, R., Janti Anak Joshua, W., & Mohd Nor, S. A. (2018). Analysing the effect of dietary prebiotics and probiotics on gut bacterial richness and diversity of Asian snakehead fingerlings using T-RFLP method. *Aquaculture Research*, 49(10), 3350-3361.

Munir, M. B., Marsh, T. L., Blaud, A., Hashim, R., Janti Anak Joshua, W., & Mohd Nor, S. A. (2018). Analysing the effect of dietary prebiotics and probiotics on gut bacterial richness and diversity of Asian snakehead fingerlings using T-RFLP method. *Aquaculture Research*, 49(10), 3350-3361.

Nandi, A., Banerjee, G., Dan, S. K., Ghosh, K., & Ray, A. K. (2017). Probiotic efficiency of *Bacillus* sp. in *Labeo rohita* challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. *Aquaculture Research*, 48(8), 4334-4345.

Valiollahi, J., Pourabasali, M., Janalizadeh, E., & Bucio, A. (2018). Use of *Lactobacillus* for Improved Growth and Enhanced Biochemical, Hematological, and Digestive Enzyme Activity in Common Carp at Mazandaran, Iran. *North American Journal of Aquaculture*, 80(2), 206-215.

Yamashita, M. M., Pereira, S. A., Cardoso, L., Araujo, A. P., Oda, C. E., Schmidt, É. C., Mouriño, J. L. P. (2017). Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. *Aquaculture Nutrition*, 00, 1–9. <https://doi.org/10.1111/anu.12498>.

Yi, Y., Zhang, Z., Zhao, F., Liu, H., Yu, L., Zha, J., & Wang, G. (2018). Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 322-330.

Considerações finais

O uso de probiótico na dieta de animais de cultivo é de extrema importância atualmente, devido as vantagens que o hospedeiro recebe. Melhorar a saúde é o principal fator esperado e observado no animal sendo um ponto crucial para reduzir perdas econômicas com surtos de mortalidade durante a criação. É nítido que a prevenção de doenças pelo uso de bactérias probióticas evita a remediação, uma prática comum e antiquada usada por produtores na aquicultura. Desta forma medidas mais ambientalmente corretas para produção como o uso de probiótico autóctone se encaixa perfeitamente no cenário atual. Contudo um ponto a ser fomentado ainda é a necessidade de se incentivar a produção destes probióticos autóctones em escala industrial, facilitando o seu uso para pequenos, médios e grandes produtores.