

Resistência de tambaquis suplementados com probiótico ao desafio com *Aeromonas hydrophila*

Any Eduarda Nanes de Oliveira Farias¹, Joel Artur Rodrigues Dias², Natalino da Costa Sousa³, Márcia Valéria Silva do Couto⁴, Higo Andrade Abe⁵, Estevam Santos Neto⁶, Raiza Tamajura Varjão Silva Santos⁷, Juliana Oliveira Meneses⁸, Fernanda dos Santos Cunha⁹, Alexandre Nizio Maria¹⁰, Paulo Cesar Falange Carneiro¹¹, Ricardo Coelho de Sousa¹², Rodrigo Yudi Fujimoto¹³

Resumo - A piscicultura brasileira vem aumentando a produção nos últimos anos, entretanto com o aumento da densidade de estocagem e manejos inapropriados, doenças bacterianas podem ocorrer no sistema de produção, causando lesões, anemia e morte dos peixes, gerando impactos econômicos e ambientais a essa cadeia produtiva. Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de tambaquis à *Aeromonas hydrophila* após suplementação probiótica. Diante disto o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do probiótico *Bacillus cereus* na resistência de juvenis de *Colossoma macropomum*, desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Para tanto, inicialmente determinou-se a concentração letal do patógeno (10^4 UFC.g⁻¹, 10^5 UFC.g⁻¹, 10^6 UFC.g⁻¹, 10^7 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹ de *A. hydrophila*). Neste experimento foi possível observar 100% de mortalidade nas concentrações 10^7 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹, seguidos por 46,6% na concentração 10^6 UFC.g⁻¹ e 100% de sobrevivência nas unidades com 10^5 UFC.g⁻¹ e 10^4 UFC.g⁻¹ do patógeno durante 96 horas de teste. A concentração letal obtida (CL₅₀) foi de $2,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Essa concentração foi então utilizada no teste de desafio sanitário, em animais que foram alimentados durante 120 dias com ração incorporada com *B. cereus* nas concentrações 10^4 UFC.g⁻¹, 10^6 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹, com mais dois tratamentos controles (com e sem a injeção do patógeno). Os animais do controle com a injeção do patógeno apresentaram menores taxas de sobrevivência de 33,4%. Já nos tratamentos que os animais foram submetidos às dietas com probiótico apresentaram 93,3%; 86,6% e 86,6% de sobrevivência, para 10^4 UFC.g⁻¹, 10^6 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹ de *B. cereus* na ração, respectivamente. Na avaliação dos parâmetros hematológicos houve aumento nas concentrações de leucócitos, linfócitos e monócitos, dos animais alimentados com probiótico. O uso probiótico espécie-específico de *B. cereus* favoreceu a resistência de juvenis de tambaqui a uma exposição infecciosa com *A. hydrophila*.

Termos para indexação: hematologia, imunostimulante, sanidade, tambaqui.

Introdução

A produção nacional de pescado no ano de 2010 foi de 1.264 mil toneladas, no qual 38% foram provenientes da aquicultura, com previsão de aumento produtivo de 8,3%/ano até 2020 (Brasil, 2010). Dentre as espécies mais produzidas no território nacional, destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie nativa de ampla distribuição geográfica que se estende nas bacias dos rios Orinoco e Amazonas. Sua potencialidade na aquicultura se refere ao seu desempenho em tamanho e peso e produção aproximada de 135,86 mil toneladas (IBGE, 2016).

Entretanto, um dos principais gargalos produtivos são as mortalidades ocasionadas por agentes infecciosos, principalmente as bactérias, que são responsáveis por grandes prejuízos reduzindo a lucratividade do setor. Para o tambaqui, já foram relatadas infecções bacterianas ocasionadas por *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas* sp. e *Aeromonas hydrophila* (Marques et al., 2016; Paixão et al., 2017).

As bactérias do gênero *Aeromonas* têm aparecido, nos últimos anos, como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (Ghenghesh, 2001). Para controlar essa proliferação das doenças bacterianas nas

¹Graduanda em biomedicina, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

³Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁴Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁵Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁶Graduando em Engenharia de pesca, Aracaju, SE.

⁷Graduanda em Engenharia de pesca, Aracaju, SE.

⁸Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁹Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹⁰Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹¹Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹²Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹³Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

pisciculturas comumente são utilizados antibióticos e quimioterápicos. No entanto, o uso destes produtos de forma errônea, se torna prejudicial para o meio ambiente e ao manipulador, possibilitando a seleção de bactérias com genes de resistentes a estes fármacos (Andrade-Porto et al., 2017; Julinta et al., 2017).

Como alternativa ao uso de antibióticos, nos últimos anos destacam-se as rações funcionais, com o uso de probióticos – que são microrganismos vivos, fornecidos na dieta do hospedeiro, que tem como intuito melhorar a sua saúde (Gatesoupe, 1999) a partir da melhoria do sistema imunológico (Mouriño et al., 2017), além de benefícios no desempenho produtivo (Giri et al., 2014). Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a resistência de tambaquis suplementados com probiótico *Bacillus cereus* ao desafio sanitário com a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*.

Material e Métodos

O trabalho foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética da Embrapa (numero 29022016.0003), e foi realizado no Laboratório de aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Primeiramente, foi determinada a concentração letal média (CL₅₀) de *A. hydrophila* inoculadas intraperitonealmente em juvenis de *C. macropomum*, A bactéria foi ativada em meio de cultura BHI por 24 horas a uma temperatura de 35° C, e em seguida foi mantida na concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹. Para o teste de concentração letal 50% (CL₅₀) foi usado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos: 1,2 x 10⁴ UFC.g⁻¹; 1,2 x 10⁵ UFC.g⁻¹; 1,2 x 10⁶ UFC.g⁻¹; 1,2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ e 1,2 x 10⁸ UFC.g⁻¹ de peixe, mais um tratamento controle (sem infecção do patógeno), todos com três repetições, contendo cinco peixes por repetição. O experimento teve duração de 96 horas, sendo a mortalidade observada a cada 4 horas, para então o CL₅₀ ser estimado pelo método Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977). Essa concentração foi então utilizada no teste de desafio sanitário dos tambaquis suplementados com probiótico

Teste in vivo de desafio após suplementação probiótica

Juvenis de tambaqui foram suplementados com dietas contendo *Bacillus cereus* à 4,2 x 10⁴ UFC.g⁻¹, 3,9 x 10⁶ e 3,3 x 10⁸ UFC.g⁻¹ de ração, mais ração controle sem a inclusão da bactéria, arraçoados durante 120 dias. Após suplementação realizou-se o desafio sanitário com injeção de *A. hydrophila* na concentração letal estipulada anteriormente. No decorrer do desafio sanitário foi observada a sintomatologia (ulceração, escurecimento da pele, exoftalmia e mortalidade) durante 96 horas. Ao final, as amostras sanguíneas dos peixes sobreviventes e moribundos foram coletadas por punção do vaso caudal, com seringas umedecidas com EDTA (3%). A partir desta uma alíquota foi utilizada para determinar o nível de glicose (mg.dL⁻¹) utilizando o medidor automático Accu-Chek Active®, 10µL de sangue foi diluído em 1mL de solução salina (0,65%) para a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer, o hematócrito (%) foi determinado pelo método de microhematócrito, a hemoglobina pelo modelo de cianometahemoglobina mensurado no analisador bioquímico Thermoplate® e para se determinar os níveis de proteína plasmática totais (g.dL⁻¹) utilizou-se o refratômetro (Quimis®). De posse dos dados de eritrócito, hematócrito e hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio = Ht x 100/nº eritrócitos = fL), HCM (hemoglobina corpuscular média = taxa Hb x 10/nº eritrócitos = pg) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média = taxa HCM x 100/Ht = g.dL⁻¹). E para a contagem de células diferencial e total de leucócitos e trombócitos, foram confeccionadas lâminas de extensões sanguíneas e coradas com Panótico NewProv.

De posse dos dados, estes foram submetidos às premissas de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Bartlett e então submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo o valor de F significativo, realizou-se o teste de Tukey (p < 0,05) para comparação das médias.

Resultados e discussão

Os valores médios de qualidade de água para temperatura (27,6±0,7 °C), oxigênio dissolvido (6,3±0,4 mg.L⁻¹), condutividade elétrica (225,0±5,0 µS.cm⁻¹), pH (6,8±0,2) e amônia total (0,7±0,1 a 1,4±0,1 mg.L⁻¹), apresentaram-se ideais para a criação da espécie como relatado por Silva e Fujimoto (2015). No teste de Cl₅₀ foi constada 100% de mortalidade nas concentrações de 1,2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ e 1,2 x 10⁸ UFC.g⁻¹ de *A. hydrophila*, seguida pela concentração 1,2 x 10⁶ UFC.g⁻¹ com 46,6 % de mortalidade, e nenhuma mortalidade nas concentrações de 1,2 x 10⁵ UFC.g⁻¹ e 1,2 x 10⁴ UFC.g⁻¹ durante as 96 horas experimentais. A partir desses resultados, obteve-se como concentração letal (CL₅₀) 2,7 x 10⁶ UFC.g⁻¹ para *A. hydrophila*, sendo então utilizada no desafio sanitário.

No desafio sanitário com a injeção do patógeno a sobrevivência dos animais foi influenciada pelas dietas contendo probiótico, no qual os peixes suplementados com $4,4 \times 10^4$ UFC, $3,9 \times 10^6$ e $3,3 \times 10^8$ UFC de *B. cereus* por g.ração⁻¹, apresentaram sobrevivência de 93,3%; 86,6% e 86,6%, respectivamente, sendo observada a sintomatologia infecciosa de escurecimento do corpo após 8 horas da injeção ao patógeno, caracterizado pelo nível dois de infecção pela escala de Ray (1954), todavia, retomando a coloração normal após 56 horas de infecção. Já para o grupo controle com a injeção do patógeno e sem o uso da ração com probiótico apresentou sobrevivência de 33,4%, sendo observadas lesões ulcerativas no local de injeção do patógeno, distensão abdominal e dilatação do ânus, que os classificou na intensidade infecciosa como grau 3 segundo protocolo de Ray (1954).

No presente trabalho a avaliação hematológica dos tambaquis sem suplementação probiótica e desafiados com o patógeno mostrou redução no número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina quando comparados aos tratamentos com uso probiótico na dieta (Tabela 1), devido a uma provável hemorragia ou hemólise característica da ação infecciosa do gênero *Aeromona*. Entretanto, nos tambaquis suplementados com probiótico o eritrograma se assemelhou ao grupo controle que não foi suplementado com a bactéria e não recebeu injeção do patógeno, demonstrando uma provável manutenção homeostática e aumento do suprimento de oxigênio (Ribeiro, 2016) mesmo com a injeção da bactéria patogênica.

Em peixe o sistema imunológico inato é o primeiro mecanismo ativado na defesa contra patógenos invasores, sendo considerado importante por desempenhar um papel significativo para a sobrevivência do hospedeiro (Biller-Takahashi, 2013). Assim sendo, observou-se uma melhora do sistema imune nos peixes suplementados com probiótico onde apresentaram maiores valores de leucócitos totais (Tabela 1) e dentre esses leucócitos, houve aumento dos linfócitos, monócitos e neutrófilos, aumentando assim a resistência dos tambaquis à infecção bacteriana (Dias et al, 2011). Estes resultados se assemelham aos encontrados por Jatobá (2008), em tilápias do Nilo utilizando dietas contendo *L. plantarum* e desafiadas com *E. durans*, no qual apresentaram a contagem de monócitos superiores nos peixes dos tratamentos que receberam dieta suplementada com probiótico.

Um maior número de trombócitos também foi encontrado nos animais suplementados com 10^4 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹ de *B. cereus* na ração (Tabela 1), este incremento da resposta imunológica do hospedeiro, pode ter auxiliado na maior resistência dos espécimes quando submetidos a uma exposição infecciosa com *A. hydrophyla* (Martins et al., 2008) pois esta célula também apresenta capacidade fagocítica em peixes.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores de sobrevivência, hemograma, contagem total de leucócitos, trombócitos e diferencial de leucócitos de *Colossoma macropomum* submetidos à infecção experimental com *Aeromonas hydrophyla* (UFC.g⁻¹).

Tratamento	CC	CD	10 ⁴ (UFC.g ⁻¹)	10 ⁶ (UFC.g ⁻¹)	10 ⁸ (UFC.g ⁻¹)
Sobrevivência	100±0,00A	33,33±1,15 B	93,33±1,15A	86,66±1,15A	86,66±1,15A
Glicose (mg.dL ⁻¹)	22,6±4,7B	ND	29,6A±3,1B	31,8±6,8AB	35,7±6,4A
Eritrócitos (x10 ⁶ µL ⁻¹)	2,10±7,5A	0,625±1,9B	1,228±4,8A	1,440±6,6A	1,593±9,0A
Hematócrito (%)	24,83±2,3A	10,73±4,3B	22,20±4,5A	23,35±3,4A	24,97±3,0A
Proteína Total (g.dL ⁻¹)	4,00±0,1A	2,32±0,2B	3,79±0,5A	4,17±0,2A	4,18±0,5A
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	4,23±2,3AB	2,34±0,7B	5,211±0,8A	5,515±1,4A	4,610±0,7A
VCM (fL)	128,5±23,5A	161,21±24,5A	151,96±24,3A	169,842±27,1A	162,271±29,1A
HCM (g.dL ⁻¹)	31,1±2,2A	28,84±3,2A	43,83±4,2A	45,943±4,1A	39,145±4,2A
CHCM (g.dL ⁻¹)	24,19±5,1A	22,405±5,5A	25,1336,2A	25,765±5,5A	23,851±4,5A
Trombócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	65,244±1,3A	1,733±0,3C	5,530±1,8B	2,366±1,4BC	11,607±1,7B
Leucócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	23,568±9,3BC	16,433±8,1C	87,489±10,5A	74,282±9,4A	63,307±9,3AB
Linfócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	21,920±9,5BC	14,743±8,1C	79,466±9,7A	59,9262±7,6B	53,6046,1AB
Monócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	0,311±0,2C	0,709±0,2C	3,653±1,2AB	5,736±0,7A	2,945±1,9BC
Neutrófilo (x10 ³ µL ⁻¹)	0,975±0,5AB	0,802±0,4B	2,343±0,7AB	3,250±1,8A	3,536±1,3A
Basófilo (x10 ³ µL ⁻¹)	0,262±0,05A	0,099±0,09A	1,178±0,01A	1,041±0,6A	0,954±0,6A
LG Pas (x10 ³ µL ⁻¹)	-	0,091±0,03C	1,179±0,54B	2,173±0,81A	0,885±0,34B

Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa p<0,05 entre os mesmos índices pelo teste de Tukey. CC- Controle sem infecção, CD- Controle desafiado.

Conclusão

Os juvenis de *Colossoma macropomum* apresentaram sensibilidade a infecção com *A. hydrophila* apresentando CL_{50} de $2,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹.

O uso probiótico espécie-específico de *B. cereus* favoreceu a resistência de juvenis de tambaqui, que proporcionou melhorias fisiológicas com base nas análises hematológicas quando submetidos a uma exposição infecciosa com *A. hydrophila*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (432622/2016-0 e 305195/2016-6)

Referências

- ANDRADE-PORTO, S. M.; AFFONSO, E. G.; KOCHHANN, D.; MALTA, J. C. O.; ROQUE, R.; ONO, E. A.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). **Aquaculture**, v. 479, p. 38-44, 2017.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with b-glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 698-703, 2014.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php?opti on=com_content&view=article&id=300 :bolet m-estatistico-da-pesca-eaquicultura2010&catid=7&Itemid=303>. Acesso em: 05 de junho 2018.
- DIAS, D.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R.; SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E. Tempo de migração dos macrófagos em matrinxãs, *Brycon amazonicus* por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 1-2, p. 147-165, 1999.
- GHENGESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 169-173, fev. 2001.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; SEN, S. S.; JENA, P. K. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 163-171, 2014.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimed sperman-karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.
- IBGE. Produção da pecuária municipal. 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2018.
- JATOBA, A.; VIEIRA, F. D.; BUGLIONE NETO, C. ; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bactéria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, p. 1201-1207, 2008.
- JULINTA, R. B.; ABRAHAM, T. J.; ROY, A.; SINGHA, J.; DASH, G. Histopathology and Wound Healing in Oxytetracycline Treated *Oreochromis niloticus* (L.) Against *Aeromonas hydrophila* Intramuscular Challenge. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 8, n. 488, p. 1-6, 2016.
- MARQUES, D. S.; FERREIRA, D. A.; PAIVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H.; ARAÚJO, J. M.; MACIEL CARVALHO, E. V.; COELHO, L. C. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. **Environmental technology**, v. 37, n. 23, p. 3030-3035, 2016.

MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P.; AMARAL, G. V.; VIEIRA, F. N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A. M. B.; PEDROTTI, F. S.; JERÔNIMO, G. T.; BUGLIONE-NETO, C. C.; PEREIRA JUNIOR, G. Alterações hematológicas em tilápia-do-nylo infectada experimentalmente com *Enterococcus sp.* **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 657- 661, 2008.

MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; PEREIRA, G. V.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L. Symbiotic supplementation on the hemato-immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 276-284, 2017.

PAIXÃO, A. E. M.; SANTOS, J. C. dos; PINTO, M. S.; PEREIRA, D. S. P.; RAMOS, C. E. C. de O.; CERQUEIRA, R. B.; SILVA, R. F. da. Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture International**, v. 25, n. 6, p. 2035- 2045, 2017.

RIBEIRO, S. C.; CASTELO, A. S.; SILVA, B. M. P. D.; CUNHA, A. D. S.; PROIETTI JUNIOR, A. A.; OBA-YOSHIOKA, E. T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 99-106, 2016.

SILVA, C. A.; FUJIMOTO, R. Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 323-332, 2015.