



**UNIVERSIDADE DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA**

GRAZIELLA VIVINE GONÇALVES DE MATOS SILVA

**RESPOSTA IMUNE INATA DO *Collossoma macropomum* SUPLEMENTADO COM
PROBIÓTICO MULTI-ESPÉCIES NA SEPSE INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*
EM SISTEMAS DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA CLARA E DE BIOFLOCOS**

**SANTARÉM, PA
2023**

GRAZIELLA VIVINE GONÇALVES DE MATOS SILVA

**RESPOSTA IMUNE INATA DO *Colossoma macropomum* SUPLEMENTADO COM
PROBIÓTICO MULTI-ESPÉCIES NA SEPSE INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*
EM SISTEMAS DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA CLARA E DE BIOFLOCOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Engenharia de Pesca, para obtenção de grau de Bacharela em Engenharia de Pesca; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas.

Orientador: Dr. Gustavo da Silva Claudiano

**SANTARÉM, PA
2023**

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- S586r Silva, Graziella Vivine Gonçalves de Matos
Resposta imune inata do *Colossoma macropomum* suplementado com probiótico multi-espécies na sepse induzida por *Aeromonas hydrophila* em sistemas de recirculação de água clara e de bioflocos. / Graziella Vivine Gonçalves de Matos Silva. – Santarém, 2023.
30 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Gustavo da Silva Claudiano.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Curso Bacharelado em Engenharia de Pesca.
1. Septicemia hemorrágica. 2. Neutrófilos. 3. Aeromonose. 4. BFT. I. Claudiano, Gustavo da Silva, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 639.3

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

GRAZIELLA VIVINE GONÇALVES DE MATOS SILVA

**RESPOSTA IMUNE INATA DO *Colossoma macropomum* SUPLEMENTADO COM
PROBIÓTICO MULTI-ESPÉCIES NA SEPSE INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*
EM SISTEMAS DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA CLARA E DE BIOFLOCOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Engenharia de Pesca, para obtenção de grau de Bacharela em Engenharia de Pesca; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas.

Orientador: Dr. Gustavo da Silva Claudiano

Conceito: 9,1

Data da aprovação 23 / 06 / 2023

Dr. Gustavo da Silva Claudiano
Universidade Federal do Oeste do Pará
Instituto de Biodiversidade e Florestas

Dr. Thiago Marinho Pereira
Universidade Federal do Oeste do Pará
Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas

MSc. Lucas Alvarenga da Silva
Universidade Federal do Oeste do Pará
Mestre em Ciências Ambientais

À minha mãe, Urânia Gonçalves de Matos, pelo amor incondicional e por sua bondade, que transcende o inimaginável. Te amo, minha mãe!

AGRADECIMENTO

À Deus, meu salvador, por me carregar em seus braços de amor quando já não consigo caminhar firmemente e por nunca me deixar desamparada. Por me mostrar que sou capaz quando eu mesma não acredito em mim e por me mostrar que não estou sozinha.

Serei eternamente grata à minha mãe Urânia Matos, e meu namorado Francisco Bannitz, que em todos os momentos estiveram ao meu lado, me dando forças para continuar quando pensei em desistir. Obrigada por tanto amor!

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano, por todo apoio desde quando ingressei no GESAQUI. Admiro-o como profissional competente, sempre dedicado em manter seus orientandos capacitados e com auxílios financeiros para execução das pesquisas. Obrigada pela oportunidade e por ter me compreendido e orientado, conte sempre comigo.

Ao Grupo de Estudos em Sanidade Aquícola (GESAQUI), ao qual sou integrante. Em especial às minhas companheiras e companheiro de laboratório Andrya, Laine, Layana, Larissa, Thayná, Vivian e Lucas, ambos contribuíram de forma essencial para minha formação profissional, cada um com sua particularidade.

Aos meus admiráveis professores do curso Bacharelado em Engenharia de pesca, Michelle e Luciano, que em parceria com o meu orientador desenvolvem a ciência na área da aquicultura. Este trabalho foi realizado primordialmente no LAMPOA, o qual possui os sistemas de produção para peixes. Não poderia deixar de agradecer à Gleika, primeiramente como profissional da área de aquicultura, como técnica no LAMPOA, pois parte deste estudo está vinculado à sua dissertação de mestrado, a qual tenho certeza de que obterá êxito, obrigada por sempre ter sido gentil e sanado minhas dúvidas no processo de construção deste trabalho.

Ao técnico Gilson e coordenador Humberto Minervino, do Laboratório de Sanidade Animal (LARSANA), pois grande parte das análises deste trabalho foram realizadas neste laboratório. O LARSANA foi minha morada por aproximadamente dois anos e meio, sentirei muita saudade de realizar pesquisa neste laboratório, guardarei os aprendizados e boas recordações de todos com quem pude conviver ali.

Agradeço a todos os docentes do curso Bacharelado em Engenharia de pesca (BEP) da UFOPA, por desenvolverem seus conhecimentos em sala de aula e aulas práticas de campo com tanta dedicação. Em especial, ao professor Tony Braga, quem tenho grande respeito e admiração; e ao professor Thiago Marinho, meu primeiro orientador de iniciação científica na graduação, ambos serão sempre lembrados com carinho fraterno.

Agradeço aos membros da Banca avaliadora por aceitarem o convite de avaliar e contribuir com este trabalho.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), ao Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA) e ao Bacharelado em Engenharia de pesca (BEP), pela oportunidade de cursar a graduação na minha amada Amazônia.

RESUMO

Este estudo avaliou a resposta imune inata e a resistência à aeromonose em *Colossoma macropomum* suplementado com probiótico multi-espécies (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*), administrado via ração e água, criados em sistemas de recirculação água clara e de bioflocos. O delineamento experimental contou com dois sistemas de cultivos e três tratamentos, suplementados com probiótico multi-espécies (AC CTL – controle; AC PA – probiótico na água; AC PR – probiótico na ração; AC PRA – probiótico na ração e na água.; BFT CTL – controle; BFT PA – probiótico na água; BFT PR – probiótico na ração; BFT PRA – probiótico na ração e na água). Determinou-se a DL50% ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) do patógeno e realizou-se a indução da sepse por *Aeromonas hydrophila*. Houve o aumento da produção de EROs nos tratamentos AC PA e BFT PR. Não houve atividade lítica nos tratamentos do sistema AC, no entanto, no sistema de bioflocos o BFT PR e o BFT PRA foram efetivos na melhora deste índice. A concentração de lisozima sérica do soro foi eficiente nos sistemas AC e BFT, quando o probiótico foi administrado na ração. A aglutinação dos títulos de anticorpos séricos não resultou em benefícios a imunidade dos tambaquis suplementados com o probiótico multicepas nos sistemas de recirculação de água clara e de bioflocos. Após a indução da sepse, 100% dos peixes morreram no sistema AC e mais de 50% dos peixes morreram no sistema BFT. No presente estudo, a suplementação com o probiótico multi-espécies pouco auxiliou na melhora da resposta imune inata dos tambaquis.

Palavras-Chave: Septicemia hemorrágica, neutrófilos, aeromonose, BFT.

ABSTRACT

This study evaluated the innate immune response and resistance to aeromonosis in *Colossoma macropomum* supplemented with multi-species probiotics (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*), administered via feed and water, reared in clear water and biofloc recirculation systems. The experimental design had two culture systems and three treatments, supplemented with multi-species probiotic (AC CTL – control; AC PA – probiotic in water; AC PR – probiotic in feed; AC PRA – probiotic in feed and water.; BFT CTL – control; BFT PA – probiotic in water; BFT PR – probiotic in feed; BFT PRA – probiotic in feed and water). The LD50% (9.0×10^8 CFU/mL) of the pathogen was determined and the induction of sepsis by *Aeromonas hydrophila* was performed. There was an increase in the production of ROS in the AC PA and BFT PR treatments. There was no lytic activity in the AC system treatments, however, in the biofloc system, BFT PR and BFT PRA were effective in improving this index. The serum lysozyme concentration was efficient in the AC and BFT systems, when the probiotic was administered in the feed. The agglutination of serum antibody titers did not result in benefits to the immunity of tambaqui supplemented with the multistrain probiotic in the clear water and biofloc recirculation systems. After sepsis induction, 100% of the fish died in the AC system and more than 50% of the fish died in the BFT system. In the present study, supplementation with the multi-species probiotic did little to improve the innate immune response of tambaquis.

Keywords: Hemorrhagic septicemia, neutrophils, aeromonosis, BFT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Juvenil de Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	13
Figura 2 - Mecanismo geral de ação dos probióticos. (1) Exclusão competitiva. (2) Produção de substâncias inibidoras. (3) Competição por nutrientes. (4) Detecção de quorum. (5) Imunidade melhorada.....	14
Figura 3 - Aspectos gerais do sistema imune do tambaqui: imunidade inata.....	16
Figura 4 - Imunidade inata em <i>Colossoma macropomum</i> criado com probiótico multi-espécies (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i>), administrado via ração e água, criados em Sistema de recirculação água clara. (a) Espécies reativas do oxigênio em leucócitos sanguíneos, (b) Atividade lítica no soro (c) Concentração de lisozima sérica, (d) Títulos de anticorpos naturais.....	22
Figura 5 - Imunidade inata em <i>Colossoma macropomum</i> criado com probiótico multi-espécies (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i>), administrado via ração e água, criados em sistema de Bioflocos. (a) Espécies reativas do oxigênio em leucócitos sanguíneos, (b) Atividade lítica no soro (c) Concentração de lisozima sérica, (d) Títulos de anticorpos naturais.....	23
Figura 6 - Taxa de mortalidade após indução da sepse grave. Taxa de mortalidade de <i>Colossoma macropomum</i> (N = 7) em sistema de recirculação água clara, inoculados com <i>Aeromonas hydrophila</i> com porcentagem de mortalidade cumulativa durante 10 dias após infecção (DPI).	24
Figura 7 - Taxa de mortalidade após indução da sepse grave. Taxa de mortalidade de <i>Colossoma macropomum</i> (N = 7) em sistema de bioflocos, inoculados com <i>Aeromonas hydrophila</i> com porcentagem de mortalidade cumulativa durante 10 dias após infecção (DPI).	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Tabaqui	12
1.2. Probióticos	13
1.3. Sistema imune inato em peixes	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Peixes e acondicionamento	17
3.2. Avaliação dos sinais clínicos e análise da sobrevivência	18
3.3. Imunidade inata.....	19
3.3.1. Concentração das espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue	19
3.3.2. Atividade lítica do soro.....	19
3.3.3. Determinação da concentração de lisozima sérica	20
3.3.4. Atividade de aglutinação bacteriana.....	20
3.3.5. Avaliação dos sinais clínicos e análise da taxa de mortalidade.....	20
3.4. Análises Estatísticas.....	21
4. RESULTADOS	21
4.1. Imunidade inata: Sistema de recirculação de água clara	21
4.2. Imunidade Inata: Sistema de Bioflocos	22
4.3. Avaliação dos sinais clínicos e análise da taxa de mortalidade	23
5. DISCUSSÃO	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das atividades produtivas que mais cresce no Brasil, com destaque para a produção de espécies nativas, em 2022, representou 31,04% da produção nacional, com 267.060 toneladas, principalmente com o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (PEIXE BR, 2023). O tambaqui apresenta diversos fatores favoráveis à sua cadeia produtiva, entre eles, a disponibilidade de pacote tecnológico de produção intensiva (PANTOJA-LIMA et al., 2021).

A criação de peixes pode ser realizada em diferentes sistemas de produção, entre eles estão: tanques-rede, viveiros escavados, barragens, sistema de recirculação de água (SRA), *Biofloc Technology System* (BFT), entres outros. Os três primeiros sistemas estão mais suscetíveis a fatores ambientais e podem causar impactos ou danos ambientais, como o aumento das concentrações de fósforos, nitrogênio e matéria orgânica na água e no sedimento e o desflorestamento de grandes áreas. Por outro lado, os sistemas SRA e BFT despontam práticas consideradas sustentáveis na aquicultura, com o tratamento de efluentes de forma mais eficiente, redução do lançamento de dejetos da atividade no meio ambiente, segurança alimentar e controle sanitário (SOUSA, 2021; MARINHO-PEREIRA et al., 2020).

O sistema de recirculação de água (SRA), constitui-se, de forma geral, na reutilização de água tratada com o filtro mecânico, onde ocorre a remoção de resíduos de fezes e ração, e o filtro biológico, no qual a mineralização de compostos orgânicos e desnitrificação são realizadas através da ação das bactérias *Nitrossomas*, realizando a oxidação da amônia a nitrito, e as *Nitrobacter*, com a oxidação de nitrito a nitrato (LIMA et al., 2015). A tecnologia BFT consiste no crescimento microbiológico das bactérias heterotróficas que ajudam a melhorar a qualidade da água, que pode ser reutilizada por diversos ciclos de produção (NOBRE et al., 2019).

A intensificação na criação de peixes, quando mal manejada, pode proporcionar alterações no ambiente dos sistemas de cultivo desencadeando os estressores de manejo (oriundos da captura, biometria, transporte e outros), que são os principais causadores de estresse na piscicultura, que por sua vez causa a quebra do equilíbrio fisiológico de acordo com o grau e a extensão da exposição do animal, afetando sua homeostase biológica (URBINATI et al., 2015). Estes fatores são predisponentes para o surgimento de surtos de infecções por bactérias, como a *Aeromonas hydrophila*, um microrganismo caracterizado morfológicamente como Gram-negativo e tipicamente oportunista, responsável por grandes prejuízos econômicos na piscicultura. Recomenda-se alguns antimicrobianos para o tratamento de *A. hydrophila*, por

exemplo o florfenicol, entretanto, seu uso não é regulamentado para espécies nativas (GALLANI, 2019).

Em virtude dessa problemática sanitária, medidas profiláticas com a introdução de probióticos vem se intensificando na aquicultura, pois trata-se de microrganismos vivos que promovem efeitos benéficos ao hospedeiro à medida que são inseridos em quantidades adequadas, tanto na ração como na água de cultivo, caracterizando-se uma alternativa viável na criação de peixes, a qual auxilia na capacidade imunológica associado ao aumento da eficiência alimentar e taxa de crescimento dos animais (KOTZENT, 2017). Os probióticos interagem com diversas células (monócitos, macrófagos, leucócitos e outras) por meio do aumento da atividade fagocítica a qual ajuda a melhorar a resposta inata em teleósteos (FARIAS, 2012).

O sistema imune dos peixes está caracterizado quanto a sua resposta em condições inadequadas de saúde e bem-estar dos indivíduos, dividido em adaptativo e inato, este representa um conjunto de respostas formando a primeira barreira do organismo contra infecções, a culminar no processo de fagocitose e destruição dos agentes infecciosos, aquele é mais tardio, entretanto, é fundamental para a imunidade duradoura, pois inicia quando o sistema imune inato não elimina uma nova infecção e permite a destruição de patógenos específicos nos peixes (GALLANI, 2019; URBINATI; CARNEIRO, 2004, p. 10).

1.1. Tambaqui

O tambaqui, assim popularmente conhecido, pertence à ordem dos Characiformes, família Serrasalminidae, sendo a única espécie do gênero *Colossoma* até então descrita (Figura 1). Considerado um peixe redondo, seu corpo é alto e comprimido lateralmente e naturalmente pode alcançar mais de 100 cm de comprimento e 30 kg de peso, o que lhe confere características de um peixe de grande porte (MORAIS; O'SULLIVAN, 2017).

Quando juvenil, o tambaqui possui o hábito alimentar onívoro, ou seja, se alimenta de frutas, sementes, organismos zooplâncton e consegue filtrar o fitoplâncton. Na fase adulta, sua preferência direciona-se ao consumo de sementes, além disto, esta espécie aceita rações comerciais quando está confinada em sistemas de produção (BARÇANTE; SOUSA, 2015).

A criação do tambaqui pode ocorrer tanto em sistema semi-intensivo, quanto em sistema intensivo, dada a sua rusticidade. Outros atributos zootécnicos são inerentes ao sucesso da sua criação, como o domínio da técnica de reprodução, com a disponibilização de formas jovens; crescimento satisfatório em cativeiro; resistência a elevadas temperaturas na água do sistema de cultivo; resistência a esporádicas quedas de oxigênio dissolvido na água; resistência a

enfermidades; e fácil comercialização (CORREA; SOUSA; MARTINS JUNIOR, 2018; BARÇANTE; SOUSA, 2015).

Devido ao crescente interesse na produção deste peixe, em 2022, o tambaqui foi a segunda espécie mais exportada, totalizando US\$ 268 mil, representando 1% na exportação da piscicultura brasileira (PEIXE BR, 2023).



Figura 1 - Juvenil de Tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Fonte: Grupo de Estudos em Sanidade Aquícola (GESAQUI), 2023.

1.2. Probióticos

A palavra probiótico deriva do grego ‘pro’ e ‘bios’, que significam ‘para a vida’, considerado amplamente como um microrganismo benéfico. Na perspectiva da aquicultura, probióticos são definidos como “vivo ou morto, ou mesmo um componente do agente microbiológico que age sob diferentes modos de ação ao conferir efeitos benéficos ao hospedeiro ou ao seu ambiente” (LAZADO; CAIPANG, 2014).

Ao aderir à parede intestinal dos peixes, os microrganismos probióticos propiciam uma barreira imunológica, pois a partir daí vários mecanismos são desenvolvidos para inibir a ligação de bactérias patogênicas à camada da mucosa gerando benefícios favoráveis e o controle de doenças (Figura 2) (VIEIRA; PEREIRA, 2017).

Um dos principais modos de ação é o de competição por sítios de adesão, também conhecido como “exclusão competitiva”, onde as bactérias probióticas colonizam o intestino e aderem à superfície epitelial interferindo na adesão de patógenos. A produção de substâncias inibidoras também está intrínseca ao modo de ação das bactérias probióticas, através da produção de compostos inibitórios como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, lisozimas,

proteases e outros, causando efeitos bactericidas em outras populações microbianas, o que pode contribuir para progressão do desempenho do crescimento, o sistema imunológico e aumento da resistência a microrganismos patogênicos (ZORRIEHZAHRA et al., 2016).

Estudos apontam que o emprego de bactérias Gram-positivas auxilia na melhoria da qualidade da água do sistema de cultivo, *Bacillus spp.* por exemplo, realiza a conversão de matéria orgânica em dióxido de carbono de forma mais eficiente do que bactérias Gram-negativas, onde a maior proporção de matéria orgânica é convertida em biomassa bacteriana ou lodo (MOHAPATRA et al., 2013; ZORRIEHZAHRA et al., 2016).

O estímulo da imunidade dos peixes também está associado ao mecanismo de ação dos probióticos, mediante o aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos. Através da mobilização dos neutrófilos ocorre a liberação de significativas quantidades de peroxidase e enzimas lisossômicas presentes nas células fagocíticas, a partir deste momento certos compostos sofrem oxidação pelas espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, radicais de hidroxila e ânions oxigênio) no processo de fagocitose (FARIAS, 2012).

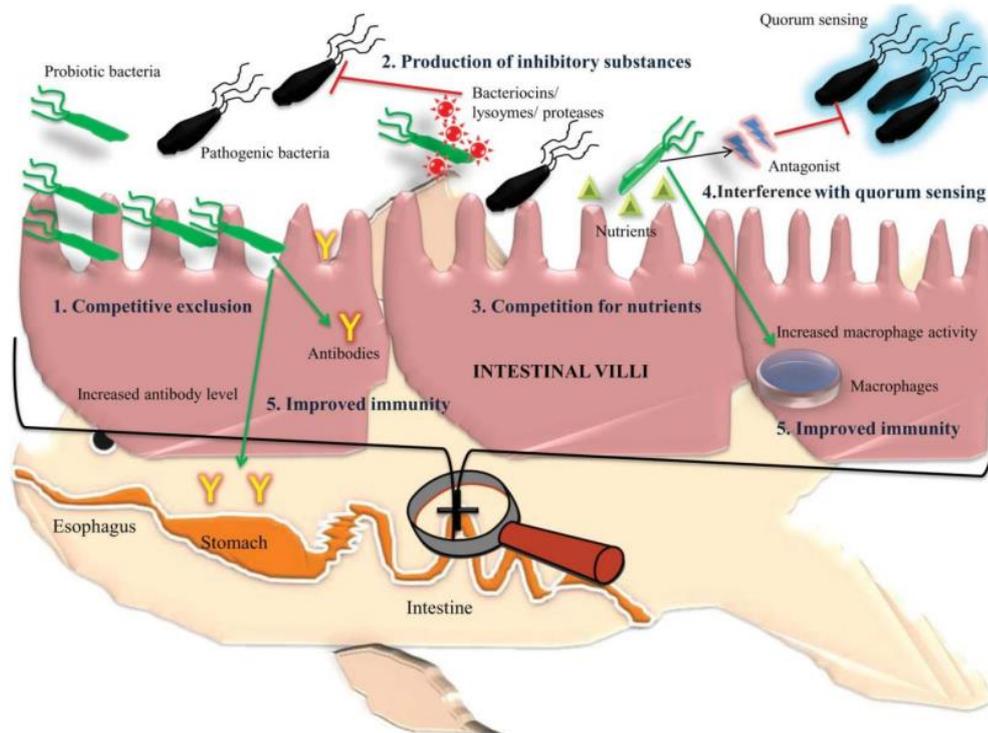


Figura 2 - Mecanismo geral de ação dos probióticos. (1) Exclusão competitiva. (2) Produção de substâncias inibidoras. (3) Competição por nutrientes. (4) Detecção de quorum. (5) Imunidade melhorada.

Fonte: ZORRIEHZAHRA et al., (2016).

1.3. Sistema imune inato em peixes

O sistema imune inato possui três tipos de barreiras principais: barreira física e química (escama, pele, muco e outros), barreira celular (granulócitos, monócitos/macrófagos e outros) e barreira humoral (sistema complemento, enzimas líticas como a lisozima, anticorpos e outros) (Figura 3) (GALLANI, 2019; SILVA 2019). A barreira do tegumento possui células especializadas em combater os microrganismos nocivos assim que tentam adentrar no organismo aquático, isso acontece porque o muco presente na pele dos peixes contém antimicrobianos como a lisozima e os peptídeos bactericidas. Esta barreira, normalmente, é eficiente no impedimento da entrada de patógenos, no entanto, se estes penetrarem nos tecidos e corrente sanguínea pode ocorrer a intervenção de outros componentes celulares e humorais que irão reconhecê-los e destruí-los (MELLO, 2016). Quando os microrganismos patogênicos conseguem ultrapassar a barreira epitelial os componentes celulares e humorais, do sistema imune inato dos peixes, reconhecem as regiões específicas de moléculas de uma ampla variedade de agentes infecciosos, qualificadas como *Padrões Moleculares Associados aos Patógenos* (PAMPs) por meio de *Receptores de Reconhecimento de Padrões* (PRR) (SOUZA et al., 2021).

O mecanismo central da resposta imune inata é a fagocitose, exercida principalmente pelos leucócitos. As células fagocíticas conseguem migrar para locais onde são necessárias, construindo e modulando a imunidade dos peixes, através de eventos de sinalização em resposta a um estímulo inflamatório. Assim, os leucócitos migram da circulação sanguínea para os tecidos, e conseguem de forma eficiente, destruir os organismos invasores, como as bactérias, pelo processo fagocítico, por meio da liberação de enzimas proteolíticas, proteínas antimicrobianas e espécies reativas de oxigênio (GALLANI, 2019).

O aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio é chamado de estresse oxidativo, e pode desregular o metabolismo celular e danificar os constituintes celulares. A produção de EROS possui relação com as respostas antioxidantes, após o aprisionamento dos microrganismos (ZORRIEHZAHRA et al., 2016).

A atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes resulta de diversos tipos de proteínas e enzimas. A lisozima, é uma enzima bactericida importante, seu combate às infecções ocorre através da sua capacidade de lisar a parede celular peptidoglicano de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As principais fontes de origem da lisozima são os monócitos/macrófagos e neutrófilos (GALLANI, 2019; SOUZA et al., 2021).

As moléculas presentes no soro sanguíneo dos teleósteos realizam processos de aglutinação e inibição de antígenos. As lectinas e imunoglobulinas são moléculas envolvidas

no mecanismo de aglutinação. Lectinas são proteínas que possuem capacidade de ligação a diferentes carboidratos, como manoses, e esta interação leva à opsonização e fagocitose das bactérias. As imunoglobulinas possuem mais especificidade que as lectinas, são proteínas produzidas pelos linfócitos B (PEREIRA, 2013).

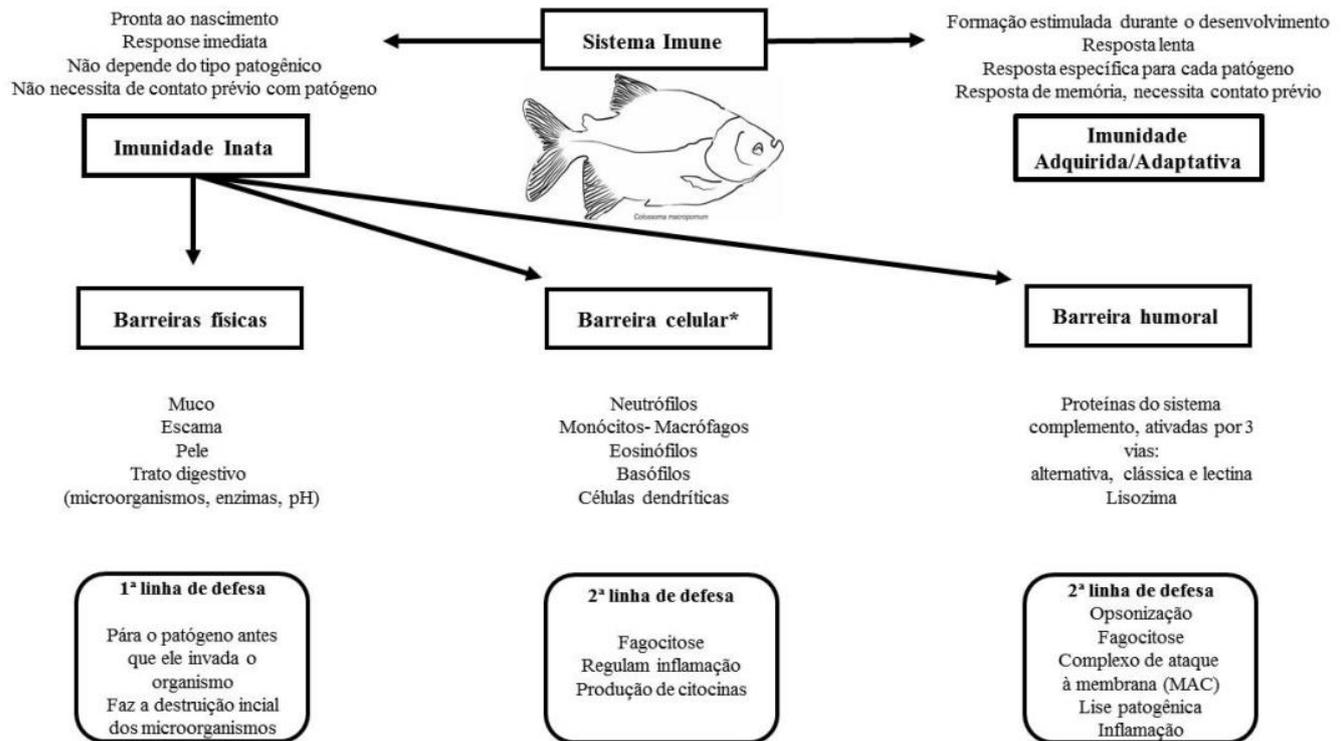


Figura 3 - Aspectos gerais do sistema imune do tambaqui: imunidade inata. *Barreira celular: não estão dispostos os linfócitos, envolvidos na imunidade adaptativa e leucócitos teciduais. **Fonte:** GALLANI, 2019.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune inata e a resistência à aeromonose em *Colossoma macropomum* suplementado com probiótico multi-espécies (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*), administrado via ração e água, criados em sistemas de recirculação água clara e de bioflocos.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a imunidade inata em tambaquis suplementados com cepas de probióticos (concentração das espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue; atividade lítica do soro; concentração lisozima sérica; atividade de aglutinação bacteriana);

- Avaliar as alterações clínicas comportamentais e a sobrevivência dos tambaquis suplementados com cepas probióticas durante a sepse induzida pela *Aeromonas hydrophila*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Peixes e acondicionamento

Foram utilizados 192 juvenis de *C. macropomum* ($111,56 \pm 3,31$ g), oriundos do Laboratório Múltiplo para Produção de Organismos Aquáticos (LAMPOA), da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), distribuídos em caixas de polietileno (400 L volume útil / 7 dias de aclimatação), em sistema de circulação de água (filtro mecânico e biológico), aeração artificial e sifonamento diário (Aprovação do Comitê de Ética nº 0620180030).

Os peixes foram cultivados em dois sistemas de cultivo: Recirculação de Água Clara (AC) e *Biofloc Technology System* (BFT). O delineamento experimental contou com dois sistemas de cultivos (AC e BFT) e três tratamentos: suplementados com probiótico multicepas *Bacillus subtilis* ($3,4 \times 10^9$ UFC/g), *Lactobacillus plantarum* ($1,2 \times 10^9$ UFC/g) e *Pediococcus acidilactici* ($1,2 \times 10^9$ UFC/g), com os seguintes tratamentos: **AC CTL** - Água clara sem adição do probiótico; **AC PA** - 1Kg/10.000 m² de água; **AC PR** - 2 Kg/1000 Kg de peixe; **AC PRA** - Probiótico na ração e na água; **BFT CTL** - *Biofloc Technology System* sem adição do probiótico; **BFT PA** - *Biofloc Technology System* 1Kg/10.000 m² de água; **BFT PR** - *Biofloc Technology System* 2 Kg/1000 Kg de peixe; **BFT PRA** - *Biofloc Technology System* Probiótico na ração e na água.

No tratamento PA inicialmente foi adicionado 0,03 g do probiótico multi-espécies em cada unidade experimental, e durante o período experimental foi incorporado duas vezes por semana na proporção supracitada. No tratamento PR, o probiótico foi adicionado na proporção de 2 kg de probiótico/1000 kg de ração, antes da alimentação do último horário diário. O probiótico foi diluído em água e permaneceu cerca de 30 minutos em aeração antes de ser fornecido com a ração ou adicionado a água.

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 unidades experimentais numa densidade de 26,67 peixes/m³ por um período de 70 dias. A quantidade de ração foi ajustada de acordo com os resultados obtidos nas biometrias que foram realizadas em intervalos de 10 dias, onde retirou-se 10 animais de cada unidade experimental e posteriormente estes foram devolvidos a suas respectivas unidades experimentais.

Ao final do período experimental, os peixes foram anestesiados (solução de benzocaína 1:20.000, em álcool 98° a 0.1 g/mL), para coleta de sangue por punção da veia caudal (3,0 mL

de sangue/n = 10). Uma alíquota (1.0 mL /amostra) foi acondicionada em tudo contendo ácido etileno-diamino-tetraacético tripotássico (EDTA k_3), destinada para a quantificação das espécies reativas do oxigênio (EROS). E a outra parcela (2,0 mL /amostra) foi acondicionada em tubo seco e centrifugada à 1.200 g, por 5 min, à 4 ° C, para obtenção do soro que foi armazenado a – 80 ° C.

3.2. Avaliação dos sinais clínicos e análise da sobrevivência

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados (CLAUDIANO et al., 2020), que foram necropsiados e fragmentos de encéfalo, rim e sangue colhidos assepticamente para cultura bacteriológica. A identificação das colônias seguiu as recomendações de Popoff (1984) e Abeyta Júnior et al., (1990), acrescida de provas bioquímicas (Bactray 3 - Laborclin®). Uma amostra do cultivo foi utilizada para extração do DNA em “Genomic DNA purification kit (Wizard). Ao final, obteve-se a concentração de DNA de 1690,9 ng/ μ L, com relação 260/280 e 260/230 2,02 e 2,04, respectivamente. A amplificação do gene 16 S RNA ribossômico seguiu Sarkar et al., (2012). As sequências foram analisadas pelo algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O limite de similaridade foi de 98% na análise de BLAST e alcançou 99% de similaridade com *A. hydrophila*.

A cepa de *Aeromonas hydrophila* (Accession number / CP007518-2) utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados (CLAUDIANO et al., 2019) e a patogenicidade da cepa foi verificada por três passagens seriadas (n=2/passagem) e reisolamento em tambaquis, os quais foram inoculados com 1,0 mL de suspensão bacteriana ($2,4 \times 10^8$ UFC/mL) por via celoma. Após a terceira passagem, as bactérias reisoladas do tecido dos peixes foram submetidas aos mesmos testes de confirmação microbiana e molecular descritos acima (CLAUDIANO et al., 2019).

Para determinação da DL50% foram utilizados 56 tambaquis (*C. macropomum*), estocados em 8 tanques (n=7; 100 L) em um delineamento completamente aleatório. Os cinquenta e seis peixes foram inoculados com 0,5 mL de dose de *A. hydrophila*: $1,5 \times 10^8$; $6,0 \times 10^8$; $1,2 \times 10^9$; $2,4 \times 10^9$ UFC/mL na cavidade celomática. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril (0,9%).

Durante a exposição (96h) suspendeu-se a alimentação e as caixas não foram sifonadas. Os peixes que apresentaram sinais clínicos irreversíveis foram mortos por aprofundamento do plano anestésico. Os valores da DL 50-96h foram calculados pelo método “trimmed sperman Karber”, e foi de 9×10^8 , limite inferior e superior em $1,78 \times 10^9$ e $4,65 \times 10^9$, respectivamente.

Para avaliação da resistência a aeromonose, foi tomado como referência os sinais clínicos e sobrevida, onde para tanto, foram utilizados 56 tabaquis, SRA ($326,27 \pm 19,38$) e BFT ($179,44 \pm 27,15$), divididos em 2 grupos ($n=28$), um deles inoculado com 0,1 mL de suspensão de *A. hydrophila* (9×10^9 UFC) em todos os tratamentos e sistemas, e o outro injetado com o mesmo volume de salina esterilizada (controle), para cada sistema. A avaliação foi por observação direta durante 10 dias após a indução da sepse (DPI).

3.3. Imunidade inata

3.3.1. Concentração das espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue

A análise da atividade respiratória dos leucócitos (*burst respiratório*) seguiu o protocolo de ANDERSON & SIWICHI (1995), com modificações. Inicialmente uma pastilha de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (NBT, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvida em 5 mL de PBS (1x pH 7,2), uma alíquota de 100 μ l de sangue heparinizado foi colocada em tubos com 100 μ l da solução NBT mais 25 μ l de PMA 10-5 (Forbol-12-Miristato-13-Acetato, 99% - 1 mg), a solução foi homogeneizada e incubada por 30 min em temperatura ambiente ($\pm 26^\circ\text{C}$). Após este período, 50 μ l da suspensão foi colocada em tubos de ensaio com 1 mL de n,n-dimetil-formamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O sobrenadante foi retirado e a densidade óptica da solução foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 540 nm.

3.3.2. Atividade lítica do soro

Para padronização do crescimento da cepa bacteriana, foi realizado um ensaio preliminar para determinação do fator de diluição essencial à contagem de colônias entre 30 a 300 UFC/placa, fundamental à confiabilidade das contagens. A bactéria patogênica foi cultivada em Tryptic Soy Broth (TSB), por 24h de incubação a 30°C , após este período o material foi centrifugado a 3000 RPM, por 10 minutos (25°C), desprezando-se o sobrenadante. A massa bacteriana precipitada foi diluída em solução salina estéril (0,9%) até a obtenção da concentração de 0,5 da escala McFarland, seguido de diluição seriada ($1,8 \times 10^{-4}$). Em seguida, 50 μ l da suspensão de *A. hydrophila* foi acrescido de 50 μ l de soro das amostras em microtubos (Eppendorf/1,5 mL) e este composto foi incubado durante 1 h, a 28°C . Posteriormente, a suspensão de 100 μ l (bactéria + soro) foi semeada pelo método de espalhamento em placa com Tryptic Soy Agar (TSA). Após o tempo de crescimento, realizou-se a contagem das colônias. Para controle da técnica foi utilizada uma suspensão de 50 μ l de PBS acrescido de 50 μ l da suspensão de *A. hydrophila*. Os resultados foram expressos em UFC.

3.3.3. Determinação da concentração de lisozima sérica

A concentração de lisozima sérica foi determinada pelo método clássico de Smolelis e Hartsell (1949), onde uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* foi usada como substrato para a lise. As amostras de soro foram descongeladas a 56°C por 30 min, para cada 50 µl de soro inativado dilui-se em 100 µl de tampão em seguida armazenados em microtubos, que foram dispensados em microplaca de microtitulação 96 poços fundo em U estéril. Foi preparada uma solução mãe padrão de lisozima onde foi pesado 0,01 g (1mg/mL) de lisozima de clara de ovo de galinha, mantendo-se em todo momento a lisozima em pó sobre refrigeração, adicionou-se em 10 mL de buffer tampão fosfato de sódio refrigerado (40000 unit/mg) e misturou-se suavemente para evitar aquecimento e manter em todo momento sob refrigeração, a solução foi congelada após o uso. As preparações consistiram em 50 µl de soro inativado e 100 µl de tampão fosfato de sódio, em seguida a suspensão de 50 µl *M. lysodeikticus* foi adicionada, avaliando-se a redução da densidade óptica, que foi medida por espectrofotometria a 450 nm e 540 nm, a cada 5 min durante 15 min, com agitação intermedia antes de cada leitura. Para controle da técnica foi utilizado um branco só de tampão fosfato e outro de tampão fosfato mais a solução bacteriana.

3.3.4. Atividade de aglutinação bacteriana

A atividade de aglutinação bacteriana natural do plasma, das amostras de todos os tratamentos, foi realizada em microplacas de microtitulação 96 poços fundo em U estéril. Adicionou-se 50 µl de PBS 1x em todos os poços, seguido de diluição seriada do mesmo volume do plasma inativado até a décima coluna dos poços. Posteriormente, 50 µl da *A. hydrophila* inativada foi incorporada ao PBS + plasma, até a décima primeira coluna dos poços, proporcionando o controle negativo nas colunas 11º (patógeno + PBS) e 12º (PBS). As placas foram incubadas por 1 hora a 36°C, e, em seguida, deixadas em OverNight a 4°C. Após 24h, realizou-se a interpretação dos resultados por meio de leitura visual das placas, comparando-se o padrão de sedimentação do poço controle com o padrão de sedimentação dos demais. Os resultados foram demonstrados no log 2 dos recíprocos dos títulos dos soros.

3.3.5. Avaliação dos sinais clínicos e análise da taxa de mortalidade

Para avaliação dos sinais clínicos e sobrevivência foram utilizados 56 tambaquis, divididos em dois grupos (n=28) correspondentes aos sistemas SRA e BFT, cada tratamento (n=7) recebeu o inóculo via cavidade celomática com 0,5 mL de suspensão de *A. hydrophila*

($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), com exceção do grupo controle (n=14) que foi injetado 0,5 mL de solução salina estéril (0,9%). A determinação foi realizada pela observação da sobrevivência dos animais durante o período de infecção após a indução da sepse. Foi estabelecido o prazo máximo de observação de dez (10) dias após a inoculação (DPI).

3.4. Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos às análises de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC), teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov; Anderson-Darling; Shapiro-Wilk e Watson). Estabelecida a normalidade foi realizada comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou de Dunn's (5%). A sobrevida seguiu o método de Kaplan-Meier (KAPLAN e MEIER, 1958; KLEINBAUM, 1995). O programa estatístico utilizado foi “software R”.

4. RESULTADOS

4.1. Imunidade inata: Sistema de recirculação de água clara

A figura 4a mostra as concentrações de espécies reativas de oxigênio observadas durante a indução da sepse em tambaquis desafiados com *A. hydrophila*. Verificou-se que os leucócitos apresentaram maior concentração de EROs ($p < 0,05$) no tratamento AC PA em relação aos peixes suplementados com probiótico na ração (AC PR), sem diferença ($p > 0,05$) dos demais grupos.

Em relação a análise lítica não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos tratados (AC PA, AC PR e AC PRA) e o controle (Figura 4b). A concentração de lisozima sérica das amostras do soro, durante o período experimental, foi significativa ($p < 0,05$) nos tratamentos AC PR e AC PRA em relação ao probiótico inserido somente na água e o controle (Figura 4c). Quanto ao teste de aglutinação, verificou-se que os peixes suplementados apresentaram menores ($p < 0,05$) títulos de anticorpos séricos em relação ao grupo controle (Figura 4d).

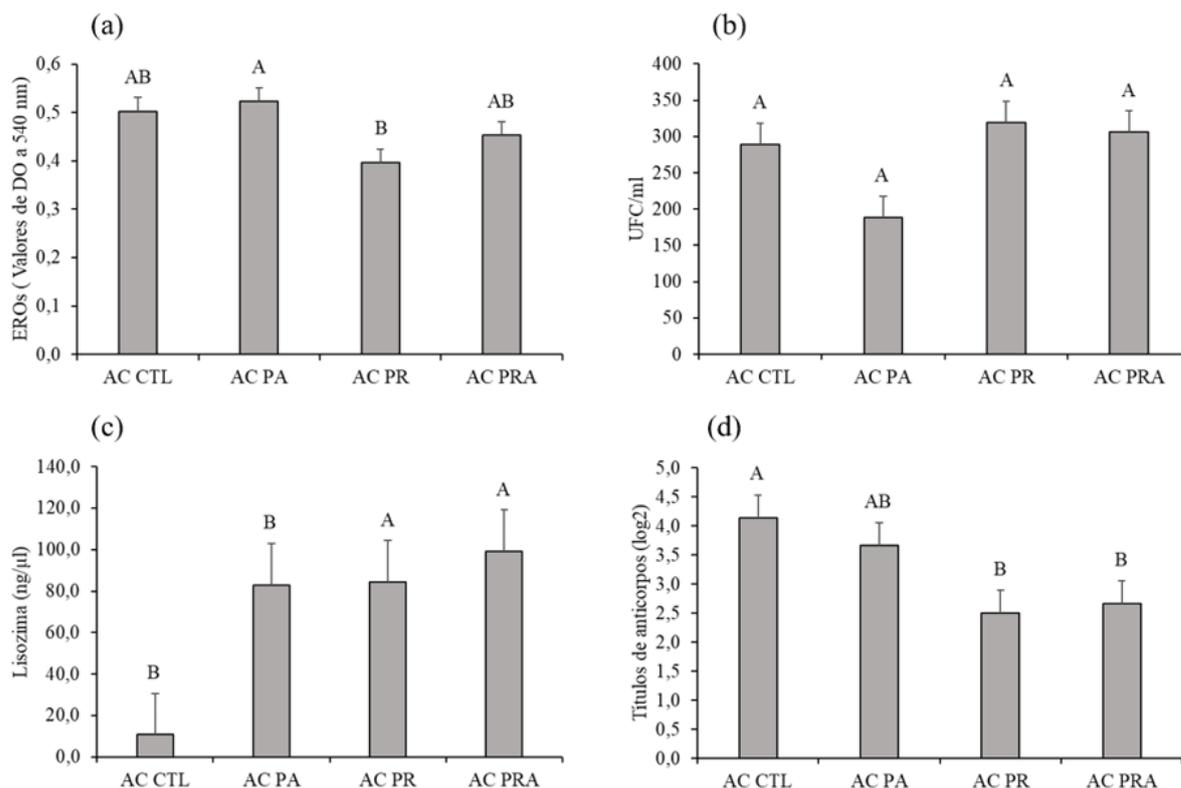


Figura 4 - Imunidade inata em *Colossoma macropomum* criado com probiótico multi-espécies (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*), administrado via ração e água, criados em Sistema de recirculação água clara. (a) Espécies reativas do oxigênio em leucócitos sanguíneos, (b) Atividade lítica no soro (c) Concentração de lisozima sérica, (d) Títulos de anticorpos naturais. Colunas verticais representam as médias de cada tratamento. As barras verticais representam o erro padrão da média. Colunas com letras em comum não diferem em 5% pelo teste de Tukey. AC – água clara; CTL – controle; PA – probiótico na água; PR – probiótico na ração; PRA – probiótico na ração e na água.

4.2. Imunidade Inata: Sistema de Bioflocos

A concentração de espécies reativas de oxigênio dos animais no sistema BFT mostrou que a suplementação com o probiótico inserido na água (BFT PA) e na ração (BFT PR) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (Figura 5a). Através da análise da atividade lítica, constatou-se que os grupos suplementados (BFT PA, BFT PR e BFT PRA) com as cepas de probiótico apresentaram maiores ($p < 0,05$) títulos de anticorpos em relação ao grupo controle (Figura 5b).

Da análise da concentração de lisozima sérica dos peixes no sistema BFT foi possível observar que o tratamento com o probiótico na ração (BFT PR) foi significativo ($p < 0,05$), assim como o probiótico na água (BFT PA), diferindo do grupo controle, o grupo BFT PRA não diferiu dos demais tratamentos (Figura 5c).

A aglutinação bacteriana dos peixes no sistema BFT mostrou que não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos tratados (BFT PA, BFT PR e BFT PRA) e o controle (Figura 5d).

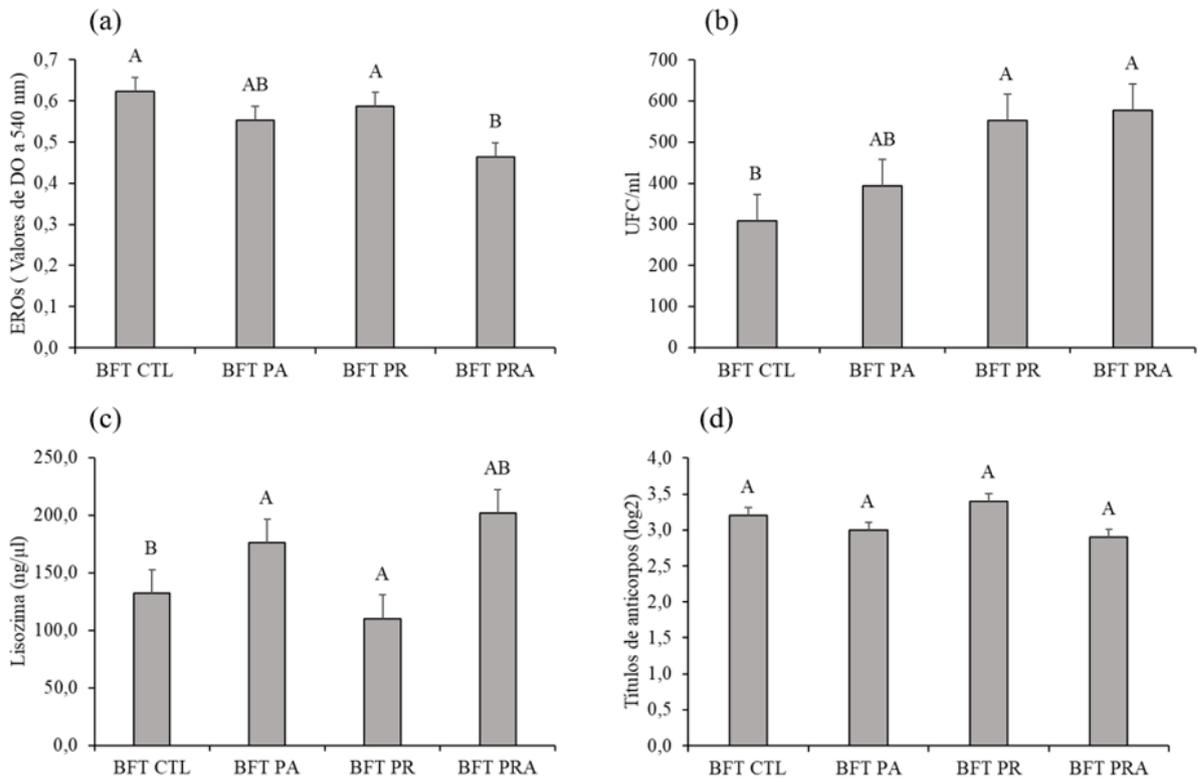


Figura 5 - Imunidade inata em *Collossoma macropomum* criado com probiótico multi-espécies (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*), administrado via ração e água, criados em sistema de Bioflocos. (a) Espécies reativas do oxigênio em leucócitos sanguíneos, (b) Atividade lítica no soro (c) Concentração de lisozima sérica, (d) Títulos de anticorpos naturais. Colunas verticais representam as médias de cada tratamento. As barras verticais representam o erro padrão da média. Colunas com letras em comum não diferem em 5% pelo teste de Tukey. BFT – bioflocos; CTL – controle; PA – probiótico na água; PR – probiótico na ração; PRA – probiótico na ração e na água.

4.3. Avaliação dos sinais clínicos e análise da taxa de mortalidade

A partir do segundo dia DPI os peixes inoculados com *A. hydrophila* apresentaram petéquias e sufusões com evolutiva progressão para ulcerações cutâneas e letargia. Em relação a análise da proteção contra a aeromonose, verificou-se que no sistema de recirculação de água clara houve 100% de mortalidade dos peixes em todos os tratamentos (figura 6).

No sistema de bioflocos, os peixes que foram suplementados com o tratamento BFT PRA apresentaram a maior taxa de mortalidade 86%, seguido do probiótico na ração (BFT PR)

e do controle 71%. Os peixes suplementados com o probiótico inserido somente na água (BFT PA) tiveram a menor taxa de mortalidade 57% (figura 7).

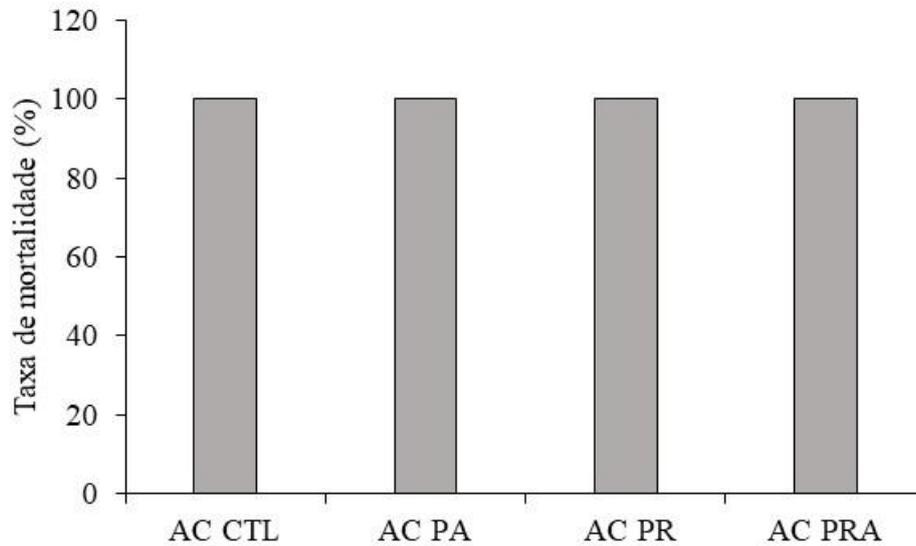


Figura 6 - Taxa de mortalidade após indução da sepse grave. Taxa de mortalidade de *Colossoma macropomum* (N = 7) em sistema de recirculação água clara, inoculados com *Aeromonas hydrophila* com porcentagem de mortalidade cumulativa durante 10 dias após infecção (DPI).

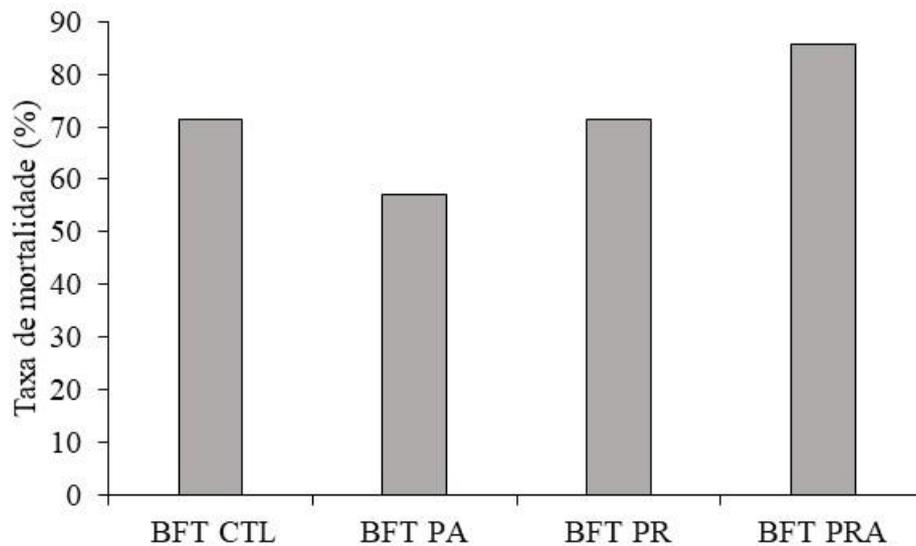


Figura 7 - Taxa de mortalidade após indução da sepse grave. Taxa de mortalidade de *Colossoma macropomum* (N = 7) em sistema de bioflocos, inoculados com *Aeromonas hydrophila* com porcentagem de mortalidade cumulativa durante 10 dias após infecção (DPI).

5. DISCUSSÃO

Os parâmetros imunológicos dos peixes são utilizados como meios para averiguar a condição de saúde e bem-estar dos indivíduos. Ao perder-se a capacidade da manutenção da homeostase biológica, proveniente de algum agente estressor, o animal desempenha seus mecanismos de defesa (PEREIRA, 2013).

No presente estudo, houve o aumento da produção de EROs nos tratamentos com o probiótico administrado na água (AC PA) (figura 4a) e na ração (BFT PR) (figura 5a), nos sistema de água clara e BFT, respectivamente, quando foram induzidos à sepse por *A. hydrophila*. O aumento deste índice sugere que probiótico multicepas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*), auxiliou na melhora do sistema imune dos tambaquis. O aumento da produção de EROs é considerado um indicador da imunidade inata em peixes. O estado de defesa do organismo estará preservado na presença de neutrófilos e macrófagos, estas células de proteção fagocitam e destroem os patógenos invasores, por meio da ação das espécies reativas de oxigênio criadas durante a respiração das células, motivadas pelos microrganismos (URBINATI et al., 2015). Alterações na qualidade da água do sistema de criação pode afetar severamente as atividades fisiológicas dos peixes, a suplementação com probióticos pode melhorar os efeitos ocasionados pelo estresse oxidativo aumentando o nível de status antioxidante (ZORRIEHZAHRA et al., 2016).

Biller-Takahashi et al., (2013), ao medir as espécies reativas do oxigênio produzidas durante a atividade de explosão respiratória por pacus desafiados com *A. hydrophila*, em sistema de fluxo contínuo de água, constataram maior produção de EROs e proteção contra patógenos, pois após a injeção do patógeno a atividade de explosão respiratória dos leucócitos aumentou, indicando que os fagócitos aumentaram a produção de EROs ativando a enzima NADPH que produz peróxido de oxigênio (H_2O_2) que é fortemente tóxico e forma a base para um sistema antibacteriano. Farias (2012) em seu estudo, pôde observar que pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com quatro níveis de inclusão de probióticos apresentaram aumento da atividade respiratória de leucócitos em todos os tratamentos paralelamente ao aumento do tempo de suplementação com probiótico ($p < 0,05$), entretanto não houve diferença significativa entre os níveis de suplementação ($p > 0,05$), ainda assim concluiu que mesmo sem diferença estatística no aumento deste parâmetro em todos os níveis de probióticos inclusos na ração, houve a melhora do sistema imunológico.

Neste trabalho, a atividade lítica do soro dos animais no sistema de água clara mostrou que não houve eficiência do probiótico em todos os tratamentos (figura 4b). Estes resultados são semelhantes aos observados por Costa et al. (2021), onde verificaram ausência de diferenças

estatísticas entre o probiótico – grupos tratados e o controle, em tambaquis criados com probiótico comercial multi-espécies (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*). No entanto, no sistema de bioflocos o probiótico na ração (BFT PR) e o probiótico administrado na ração e água (BFT PRA) foram efetivos na melhora do índice de atividade lítica (figura 5b). Petrillo (2015) verificou resultados parecidos com estes quando avaliou a atividade lítica de peixes suplementados com probiótico após indução da sepse com *A. hydrophila*, durante a evolução do processo inflamatório, após 24 e 48 horas, grupos tratados e estimulados apresentaram maior capacidade lítica sobre as colônias bacterianas, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo controle.

A concentração de lisozima sérica do soro foi eficiente nos sistemas AC e BFT (figura 4c e 5c) quando o probiótico foi administrado na ração. A lisozima faz parte da imunidade inespecífica dos peixes. É uma enzima bacteriolítica, encontrada principalmente nos monócitos/macrófagos, neutrófilos e nos grânulos das células granulares eosinófilas do intestino. A ação bactericida da lisozima está associada a hidrolização do peptidoglicano das paredes celulares bacterianas, proporcionando a lise celular tanto de bactérias Gram-positivas como de Gram-negativas (URIBE et al., 2011; RIBEIRO, 2019). Gallani et al., (2021), ao caracterizar padrões da resposta imune inata do tambaqui sobre a infecção por *A. hydrophila*, notaram que em relação aos peptídeos antimicrobianos, a lisozima foi modulada positivamente ($p < 0,05$) em todos os períodos após a infecção (0 h (controle), 6 h, 1 dia, 7 dias e 14 dias pós-infecção), isso porque essa enzima intermedia a proteção contra microrganismos patogênicos, portanto a determinação de sua concentração é relevante em estudos imunológicos em peixes.

Neste estudo, a aglutinação dos títulos de anticorpos séricos não resultou em benefícios a imunidade dos tambaquis suplementados com o probiótico multicepas nos sistemas de recirculação de água clara e de bioflocos (figura 4d e 5d). Resultados similares foram observados por Petrillo (2015), ao avaliar a atividade de aglutinação bacteriana de tilápias-do-Nilo alimentadas com dieta adicionada de diferentes concentrações de *Bacillus*, após o estímulo inflamatório com *A. hydrophila*. É possível que o período mínimo necessário para que o tambaqui produza anticorpos suficientes seja superior a 10 dias DPI, para que a aglutinação seja detectada. Contudo, Claudiano et al. (2019) ao estudar os distúrbios hematológicos, a imunidade inata e a sobrevivência de pacus inoculados com *A. hydrophila* puderam observar que a capacidade de aglutinação de anticorpos dos peixes contra o patógeno aumentou ($p < 0,05$) em 3 HPI em comparação ao grupo controle.

No sistema de água clara a suplementação com o probiótico multicepas pouco auxiliou na imunidade inata dos peixes, visto que durante o período experimental, 10 dias após a indução da sepse, 100% dos animais morreram (figura 6), ainda assim, de acordo com os parâmetros imunológicos avaliados, percebe-se que houve resistência dos indivíduos perante a sepse. Estes resultados podem estar relacionados a sinais severos da infecção e associados a uma elevada carga bacteriana (CLAUDIANO et al., 2019). No sistema de bioflocos, a taxa de mortalidade foi superior a 50% em todos os tratamentos, 10 dias após a indução da sepse (figura 7). Estes resultados sugerem que a suplementação com o probiótico multicepas pouco auxiliou na resistência dos animais quando submetidos a bactérias patogênicas. Conforme avalia Costa et al. (2021), tambaquis suplementados com probióticos multiespécies incorporado a água e ração por 60 dias consecutivos, não resultou em benefícios à qualidade da água, ao desempenho zootécnico e sanidade, no entanto, se mostrou seguro, a perceber pela ausência de alterações clínicas e por apresentar porcentagem relativa de sobrevivência de 100% durante o período experimental.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes estudos sobre a utilização de probióticos em peixes podem apresentar resultados controversos, com diferentes respostas nos parâmetros produtivos e fisiopatológicos. Isso pode estar relacionado a diferentes espécies de bactérias utilizadas como probiótico, além disso, é necessário considerar que algumas são isoladas do trato gastrointestinal da mesma espécie de peixe em estudo, e outras são oriundas de outros animais. No presente estudo, a suplementação com o probiótico multi-espécies pouco auxiliou na melhora da resposta imune inata dos tambaquis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYTA JR, C.; KAYSNER, C. A.; WEKELL, M. M.; STOFF, R. F. **Incidence of motile Aeromonas from United States west coast shellfish growing estuaries.** Journal of Food Protection, v. 53, n. 10, p. 849-855, 1990.
- ANUÁRIO 2023. **Peixe BR da piscicultura.** Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anoario>. Acesso em: abril de 2023.
- BARÇANTE, B. & SOUSA, A. B. **Características zootécnicas e potenciais do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para a piscicultura brasileira.** PubVet, v. 9, p. 287-347, 2015.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V.; GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C. **Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*.** Brazilian Journal of Biology, v. 73, p. 425-429, 2013.
- CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F. A.; MIRANDA, R. L.; MARTINS, I. M.; OTANI, F. S.; MUNDIM, A. V.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. **Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*.** *Fish & shellfish immunology*, 88, 259-265, 2019.
- CLAUDIANO, G. S.; MORAES, F. R.; FERNANDES, D. C.; VANTINI, J. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; ETO, S. F.; MARINHO-NETO, F. A.; MACEDO, H. J. A.; MANRIQUE, W. G.; MORAES, J. R. E. **Experimental infection by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*: DL50, neurological disturbances, and mortality.** *Comparative Clinical Pathology*, 29, 1119-1126, 2020.
- CORREA, R.O.; SOUSA, A. R. B.; MARTINS JUNIOR, H. **Criação de tambaquís.** Brasília, DF: Embrapa, 2018. Disponível em: <http://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>
- COSTA, L. F. A.; LIMA, J. S.; SIQUEIRA, A. M. A.; SILVA, E. C. C.; LIMA, V. C. F.; SILVA, L. A.; SILVA, S. R.; SANTOS, T. F.; FUGIMURA, M. M. S.; VAZ, L. J.; MARCUSSO, P. F.; CLAUDIANO, G. S. **Effect of multi-species probiotic administration in *Colossoma macropomum* juvenile rearing: supplementation and bioremediation.** *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1721-1729, 2021.
- FARIAS, T. H. V. **Probiótico na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*): avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e desempenho produtivo.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2012.
- GALLANI, S. U. **Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*: avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro.** 2019. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2019.
- GALLANI, S. U.; VALLADÃO, G. M. R.; DE OLIVEIRA ALVES, L.; KOTZENT, S.; HASHIMOTO, D. T.; WIEGERTJES, G.; KIRSTEN, K.; KREUTZ, L. C.; PILARSKI, F. **Patterns of the innate immune response in tambaqui *Colossoma macropomum*:**

Modulation of gene expression in haemorrhagic septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104638, 2021.

KAPLAN, E. L. & MEIER, P. **Non parametric estimation from incomplete observation.** *Journal of the American Statistics Association*, 53:457-481, 1958.

KLEINBAUM, D.G. **Survival Analysis: A Self-Learning Text**, Springer, New York, 1995.

KOTZENT, S. **Bactérias com potencial probiótico do intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*).** 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. **Mucosal immunity and probiotics in fish. Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 1, p. 78-89, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.015>

LIMA, J. F.; TAVARES-DIAS, M.; YOSHIOKA, E. T. O.; SANTOS, E. F.; DUARTE, S. S.; BASTOS, A. M.; MONTAGNER, D. **Sistema fechado simples de recirculação para recria de peixes ou camarões de água-doce.** Amapá: Embrapa, (Embrapa Amapá. Comunicado Técnico, 136), 2015.

MARINHO-PEREIRA, T.; CAVERO, B. A. S.; OLIVEIRA, C. P. F.; ARIDE, P. H. R. OLIVEIRA, A. T. **Frequência alimentar alternativa para a recria de *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Bryconidae) e *Colossoma macropomum* Cuvier, 1822 (Characiformes, Serrasalminidae) em sistema BFT sob baixa salinidade.** Faculdade de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, 97, 2020.

MELLO, M. M. M. **Uso do β -glucano e avaliação de indicadores de estresse e do sistema imune inato de pacu após manejo de transporte.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2019.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; KUMAR, V.; DEBOECK, G.; MOHANTA, K. N. **Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention.** *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97(3), 405-430, 2013.

MORAIS, I. S. & O'SULLIVAN, F. L. A. **Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816).** *Scientia Amazonia*, v. 6, n. 1, 81-93, 2017.

NOBRE, S. J. C.; ALCÂNTARA FARIAS, M. R.; IMBIRIBA, R. C. C. **Qualidade de água na recria de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em sistema de bioflocos.** Congresso brasileiro de engenharia de pesca – XXI CONBEP. Manaus-AM, 2019.

PANTOJA-LIMA, J.; ROCHA, M. J. S.; CASTRO, L. A.; AMARAL, A. C.; SCHERER FILHO, C.; PAIXÃO, R. V.; FELIJÓ, J. C.; ARAÚJO, H. S.; ARIDE, P. H. R.; OLIVEIRA, A.T.; MATTOS, B. O. **O estado da piscicultura na Amazônia brasileira.** Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias. Atena, Ponta Grossa, 86-102, 2021.

PEREIRA, S. A. **Parâmetros imunológicos de surubins vacinados e suplementados com probiótico**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Curso de Engenharia de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

PETRILLO, T. R. **Efeito probiótico do *Bacillus amyloliquefaciens* na aerocistite aguda em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, 2015.

POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel. In: DRIEG, Noel R. (Ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 545-548, 1984.

RIBEIRO, R. C. P. **Uso do selênio como modulador do estresse, sistema imune inato e antioxidante em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2019.

SARKAR, A.; SAHA, M.; ROY, P. **Identification and typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR fingerprinting**. Aquaculture Research and Development, v. 3, n. 6, 2-4, 2012.

SILVA, A. F. **Eficácia do levamisol como modulador de respostas de estresse, do sistema imune inato e anti-helmíntico em tambaqui**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2019.

SOUSA, T. M. **Avaliação da engorda inicial de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em sistema de recirculação de água**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Curso de Zootecnia, campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2021.

SOUZA, D. D. M.; SOUSA, R. L.; CHAGAS, E. C.; SANTOS, M. C. (2021). **Imunologia dos peixes amazônicos: o quanto conhecemos?** Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias. P. 277-293, Ponta Grossa – PR: Atenas, 2021.

URBINATI, E. C. & CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura intensiva**. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropicais intensiva. TecArt, São Paulo, p. 171-194, 2004.

URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; SERRA, M.; WOLKERS, C. P. B.; SABIONI, R. E. **Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas**. Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas: Aspectos biológicos, fisiológicos e sanitários de organismos aquáticos, v. 1, p. 381-416, 2015.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. **Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review**. Veterinarni medicina, v. 56, n. 10, p. 486, 2011.

VIEIRA, B. B. & PEREIRA, E. L. **Potencial dos probióticos para o uso na aquicultura**. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 14, n. 2, p. 1223-1241, 2017.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; DELSHAD, S. T.; ADEL, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; LAZADO, C. C. **Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update**

on their multiple modes of action: a review. *Veterinary quarterly*, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
REITORIA
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA CENTRAL RUY BARATA

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

1. Identificação do autor

Nome completo: Graziella Vivine Gonçalves de Matos Silva

CPF:010.295.622-70

RG:6387746

Telefone (93) 988029387

E-mail: graziella.vivine@gmail.com

Titulação recebida: Bacharel em Engenharia de pesca

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página de rosto?

() Sim () Não

2. Identificação da obra

() Monografia () TCC () Dissertação () Tese () Artigo científico () Outros: _____

Título da obra: Resposta imune inata do *Colossoma macropomum* suplementado com probiótico multi-espécies na sepse induzida por *Aeromonas hydrophila* em sistema de recirculação de água clara e de bioflocos.

Programa/Curso de pós-graduação: Curso Bacharelado em Engenharia de Pesca

Data da conclusão: 23/06/2023.

Orientador: Gustavo da Silva Claudiano

E-mail: gsclaudiano@gmail.com

Co-orientador:

Examinadores:

Dr. Thiago Marinho Pereira

MSc. Lucas Alvarenga da Silva

3. Termo de autorização

Autorizo a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) a incluir o documento de minha autoria, acima identificado, em acesso aberto, no Portal da instituição, na Biblioteca Ruy Barata, no Repositório Institucional da Ufopa, bem como em outros sistemas de disseminação da informação e do conhecimento, permitindo a utilização, direta ou indireta, e a sua reprodução integral ou parcial, desde que citado o autor original, nos termos do artigo 29 da Lei nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998. Essa autorização é uma licença não exclusiva, concedida à Ufopa a título gratuito, por prazo indeterminado, válida para a obra em seu formato original.

Declaro possuir a titularidade dos direitos autorais sobre a obra e assumo total responsabilidade civil e penal quanto ao conteúdo, citações, referências e outros elementos que fazem parte da obra. Estou ciente de que todos os que de alguma forma colaboram com a elaboração das partes ou da obra como um todo tiveram seus nomes devidamente citados e/ou referenciados, e que não há nenhum impedimento, restrição ou limitação para a plena validade, vigência e eficácia da autorização concedida.

Documento assinado digitalmente
gov.br GRAZIELLA VIVINE GONCALVES DE MATOS
Data: 26/06/2023 16:37:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Gustavo da Silva Claudiano
Professor Adjunto
IBEF - Instituto de Biodiversidade e Floresta
Universidade Federal do Oeste do Pará -UFOPA

Santarém, 26/06/2023

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

4. Tramitação

Secretaria / Coordenação de curso

Recebido em ____/____/____. Responsável: _____

Siape/Carimbo