



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

Samira Teixeira Leal de Oliveira

**ADITIVOS NATURAIS PARA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E SEU
POTENCIAL NO COMBATE AOS EFEITOS DA INFECÇÃO POR
*Aeromonas hydrophila***

Recife, PE

2016

SAMIRA TEIXEIRA LEAL DE OLIVEIRA

**ADITIVOS NATURAIS PARA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E SEU
POTENCIAL NO COMBATE AOS EFEITOS DA INFECÇÃO POR
*Aeromonas hydrophila***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Recife, PE

2016

Ficha catalográfica

O48a Oliveira, Samira Teixeira Leal de
 Aditivos naturais para tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e seu
 potencial no combate aos efeitos da infecção por *A. hydrophila* /
 Samira Teixeira Leal de Oliveira. – Recife, 2016.
 130 f. : il.

 Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa.
 Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e
 Fisiologia Animal, Recife, 2016.
 Inclui referências e anexo(s).

 1. Extrato 2. Óleos essenciais 3. Prebiótico 4. Probiótico
 5. Simbiótico 6. Aquicultura 7. Desafio 8. Microbiologia I. Costa,
 Mateus Matiuzzi da, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

“Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida desde que respeitadas às normas de ética científica”.

Recife, 08 de julho de 2016.

Samira Teixeira Leal de Oliveira _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa - Orientador (UNIVASF)

Prof.^a. Dr.^a. Jaqueline Bianque de Oliveira (UFRPE)

Prof.^a. Dr.^a Elizabeth Sampaio de Medeiros (UFRPE)

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke (UFRPE)

Prof.^a Dr.^a Josir Laine Aparecida Veschi (EMBRAPA Semiárido)

Dedicatória

Dedico a Meu João Marcelo.

Agradecimentos

À Deus pela vida, saúde e oportunidade de estudar e concluir um nobre doutorado.

Ao meu filho João Marcelo Teixeira Oliveira, por esse amor sem limites que permitiu-me conhecer... por toda alegria que é estar ao seu lado!

Aos meus pais pela confiança e toda admiração que sempre tiveram e que permanece por mim, agradeço. Mãe, obrigada por toda a força fornecida quando eu precisei...

Aos meus amados irmãos Tércio Teixeira Leal de Oliveira e Pablo Teixeira Leal de Oliveira, por continuarem com seu apoio independente de meus erros e acertos, sempre ao meu lado e por todos os ensinamentos. Tércio obrigada ainda por toda sua ajuda com meu bebê, convivência e companheirismo. As minhas sobrinhas-afilhadas, Luísa Duarte Leal de Oliveira e Letícia Duarte Leal de Oliveira, lindas, meus amores, pelas diversões e carinhos.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Mateus Matuzzi da Costa, que contribuiu de forma intensa na minha formação, desde a graduação, mestrado e agora no doutorado, obrigada pela grande orientação, confiança, oportunidades e ensinamentos.

Agradeço a professora Gisele Veneroni-Golveia, por todos os ensinamentos e orientações.

As minhas amigas Jennifer Figueiredo, Sílvia Negreiros, Izabela Santana, Renilde Cordeiro, Ruan Franco, Naiane Darklei, Barbara Silveira em especial a minha amiga companheira Valdenice Felix, por todo suporte, incentivos, momentos de alegria e distração... Trabalhar é uma distração com vocês!!!! Denoca, sua bondade não tem tamanho.

A muitos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf, a Diego, Graciele, Riane, Chirles, Jamille, Thais, Mariana, Samily, Werônica, Naiana, Ceíça, Neadja, Jefferson, por ter aberto ou fechado a torneira, ou por apenas sua amizade...

Agradeço aos meus amigos, Eliária Reis, Marcos Drumond, minha cunhada Sarha Rachel, a todas as minhas queridas primas, que de uma grande forma, contribuíram com sua amizade, contribuições eternas.....

Agradeço a CODEVASF sempre parceiros, em especial ao engenheiro, amigo Rozzanno, pelo apoio ao desenvolvimento das pesquisas.

À Univasf por ceder espaço para realização das minhas pesquisas. Aos funcionários do Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF, obrigada pelo apoio quando foi necessário.

Agradeço aos membros do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, ao prof. Dr Anísio Francisco Soares pelo apoio sempre que necessário. Agradecemos a FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A todos que ajudaram a construir mais uma das fases da minha carreira e da minha vida, o que não é uma tarefa fácil.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Piscicultura.....	17
2.2 Antimicrobianos em piscicultura.....	20
2.3 Alternativas ao uso de antibióticos em piscicultura.....	22
3 - OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 1. Extrato de própolis na alimentação de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) e seu efeito após infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i>	34
CAPÍTULO 2. Óleos essenciais: sensibilidade frente à <i>Aeromonas hydrophila</i> e sua inclusão na alimentação de tilápia.....	49
CAPÍTULO 3. Utilização do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na alimentação de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) e seu efeito após infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i>	61
CAPÍTULO 4. Produtos naturais como alimentos funcionais para a tilápia do Nilo desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	81
CAPÍTULO 5. Dieta com <i>Ascophyllum nodosum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na alimentação de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) e seu efeito após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i>	106
5 - CONCLUSÕES	103
ANEXOS	
ANEXO 1 – Parecer de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF.....	126
ANEXO 2 – Figura da curva de calibração da lisozima.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EEP	Extrato etanólico de própolis
OEO	Óleo essencial de orégano
FAM	Farinha da alga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
FAO	Food and Agriculture Organization
CIM	Concentração inibitória mínima
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
CIRPA	Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura
PCR	Reação em cadeia de polimerase
TSA	Ágar Triptona de Soja
AXOS	Arabinosilano-oligossacarídeos
MOS	Mananoligossacarídeo
BHT	Butil hidroxil tolueno
UFC	Unidades formadoras de colônias
L	Litro
Kg	Quilograma
g	Gramma
cm	Centímetro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MH	Muller Hinton
IHS	Índice hepatossomático
OD	Densidade óptica
CAA	Conversão alimentar aparente
UV	Ultravioleta
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação
EA	Eficiência alimentar
RC	Rendimento de carcaça sem cabeça
FCC	Fator de condição corporal
RCC	Rendimento de carcaça com cabeça

LISTA DE SÍMBOLOS

N.º	Número
%	Porcentagem
+	Positivo
-	Negativo
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
Km ³	Quilômetro cúbico

LISTA DE QUADROS

Capítulo 02

Quadro 1.	Composição das rações experimentais.....	58
Quadro 2.	Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais diluídos em metanol frente à <i>A. hydrophila</i> obtidas de peixes do Vale do São Francisco.....	58
Quadro3.	Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com óleo essencial de orégano.....	58
Quadro 4.	Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente, eficiência alimentar e consumo de ração dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo óleo essencial de orégano.....	59
Quadro 5.	Valores médios de sobrevivência, índice hepatossomático (IHS) e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo óleo essencial de orégano.....	59

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo 01	
Tabela 1. Composição das rações experimentais.....	38
Tabela 2. Valores médios de crescimento dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com 24,4 mL kg ração ⁻¹ de extrato de própolis (2) e ração testemunha (1)...	40
Capítulo 03	
Tabela 1. Composição das rações experimentais.....	76
Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente (CAA), eficiência alimentar (EA e fator de condição corporal (FCC) dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo níveis crescentes do probiótico <i>S. cerevisiae</i>	77
Tabela 3. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados <i>S. cerevisiae</i>	78
Tabela 4. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossomático (IHS) e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo <i>S. cerevisiae</i> ..	79
Capítulo 04	
Tabela 1. Composição das rações experimentais.....	102
Tabela 2. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos às rações contendo aditivos naturais.....	103
Tabela 3. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossomático (IHS) e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo aditivos naturais.....	103
Capítulo 05	
Tabela 1. Composição das rações experimentais.....	111
Tabela 2. Composição bromatológica da farinha da alga marinha marrom (<i>A. nodosum</i>) informada pelo fabricante.....	111
Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente, eficiência alimentar e fator de condição corporal dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo aditivos alimentares.....	115
Tabela 4. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos a alimentos funcionais.....	116
Tabela 5. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossomático e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração aditivos alimentares.....	117

LISTA DE FIGURAS

	Capítulo 01	Pág.
Figura 1.	Sobrevivência dos alevinos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), submetidos a desafio com inoculação de <i>A. hydrophila</i> . - (1) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina; (2) ração contendo 24,4 mL kg ⁻¹ de extrato de própolis, inoculados com solução salina; (3) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (4) ração contendo 24,4 m kg ⁻¹ de extrato de própolis, inoculados com <i>A. hydrophila</i>	40
Figura 2.	Acompanhamento das lesões ocasionadas pela infecção por <i>A. hydrophila</i> nos alevinos de tilápia do Nilo alimentados (T4) ou não (T3) com extrato de própolis.....	41
Capítulo 02		
Figura 1.	Parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo níveis crescentes de óleo essencial de orégano: a) peso final; b) ganho de peso; c) consumo de ração; d) conversão alimentar aparente eficiência alimentar; e) eficiência alimentar: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo 1,0% de OEO inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (4) grupo recebendo ração contendo 1,5% de OEO inoculados com <i>A. hydrophila</i>	60
Capítulo 03		
Figura 1.	Conversão alimentar aparente dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico <i>S. cerevisiae</i> : (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo 4x10 ⁸ UFC kg ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo 6x10 ⁸ UFC kg ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (4) grupo recebendo ração contendo 8x10 ⁸ UFC kg ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i>	77
Figura 2.	Eficiência alimentar dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico <i>S. cerevisiae</i> : (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo 4x10 ⁸ UFC kg ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo 6x10 ⁸ UFC kg ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (4) grupo recebendo ração contendo 8x10 ⁸ UFC kg ⁻¹ <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i>	78
Figura 3.	Comprimento padrão dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à	

	rações contendo níveis crescentes do probiótico <i>S. cerevisiae</i> : (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg^{-1} <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg^{-1} <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg^{-1} <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i>	79
Figura 4.	Análise de PCR-DGGE do intestino dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico <i>S. cerevisiae</i> (a) antes do desafio, (b) após o desafio: (M) marcador molecular; (T1.1) grupo recebendo ração testemunha; (T1.2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (T2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg^{-1} <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (T3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg^{-1} <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (T4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg^{-1} <i>S. cerevisiae</i> inoculados com <i>A. hydrophila</i>	80

Capítulo 04

Figura 1.	Características e rendimento de carcaça das tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo aditivos naturais: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração $^{-1}$ inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com <i>A. hydrophila</i>	104
Figura 2.	Parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo aditivos naturais: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração $^{-1}$ inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com <i>A. hydrophila</i>	105
Figura 3.	Análise de PCR-DGGE do intestino dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos às rações contendo aditivos naturais: (T1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (T2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração $^{-1}$ inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (T3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com <i>A. hydrophila</i>	105

Capítulo 05

Figura 1.	Conversão alimentar aparente dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo aditivos alimentares: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com <i>A. hydrophila</i> ; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com <i>A. hydrophila</i>	115
Figura 2.	Sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo diferentes aditivos alimentares: (1) grupo recebendo ração	

testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com *A. hydrophila*..... 117

RESUMO

A piscicultura vem se destacando com seu crescimento acelerado. A elevada demanda na atividade, resultou em danos ambientais e baixa produtividade. Em função desse quadro, surge a necessidade de melhorar a resistência às doenças, as taxas de crescimento e um melhor aproveitamento da dieta fornecida, assim trouxe o uso de alternativas aos antimicrobianos em práticas de aquicultura. Com esse princípio, a presente pesquisa objetivou avaliar os efeitos do uso de aditivos naturais, como promotores de crescimento e imunoestimulantes, em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio de desafios sanitários com *Aeromonas hydrophila*. Para tanto foram testados o extrato etanólico de própolis (EEP), óleo essencial de orégano (OEO), *Saccharomyces cerevisiae* (probiótico), *Ascophyllum nodosum* (prebiótico) e um simbiótico (em conjunto o mesmo pre- e probiótico) em rações para as tilápias. A pesquisa foi constituída de cinco experimentos “*in vivo*”. Tais experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf, assim como o isolado utilizado foi proveniente da bacterioteca deste laboratório. Foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações peletizadas, fabricadas exclusivamente para os estudos em questão. As condições ambientais para os animais foram mantidas nos limites adequados para a espécie, exceto para o experimento do probiótico (*S. cerevisiae*), no qual foi usada também como fator de estresse. Após 30 dias de alimentação, foram realizados o desafio com *A. hydrophila*. Ao final dos experimentos, os alevinos, foram avaliados quanto aos parâmetros zootécnicos, sobrevivência, imunológico e microbiológicos. No experimento com o EEP, verificou-se que, não influenciou nos parâmetros de sobrevivência, desempenho e rendimento de carcaça dos alevinos, porém contribuiu na recuperação das lesões provocadas por *A. hydrophila*, como também foi observado uma maior diversidade no microbioma intestinal pela PCR-DGGE. Na escolha do óleo essencial, foi realizado um teste “*in vitro*”, para avaliar atividade antimicrobiana frente a 100 isolados de *A. hydrophila*: orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e pimenta do reino (*Piper nigrum*). O OEO foi o que apresentou melhor atividade e, ao ser testado “*in vivo*”, a dose 0,5 e 1% Kg ração⁻¹, foram associados aos melhores parâmetros de desempenho. O OEO também contribuiu para uma maior diversidade de micro-organismos intestinais. Na experimentação com o probiótico, suas doses foram escolhidas a partir de recomendações fornecidas pelo fabricante, tal aditivo provocou mudanças no microbioma intestinal e, o nível de 6x10⁸ UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* teve melhor efeito sobre o desempenho, na utilização do alimento mesmo os peixes sob condições de estresse. A *A. nodosum*, embora seus valores de desempenho e sobrevivência tenham sido superiores ao grupo controle, estes não apresentaram diferença significativas, mas o aditivo contribuiu para uma melhor colonização de leveduras no intestino dos alevinos em comparação ao grupo controle. Quando na união ao probiótico (simbiótico), um efeito sinérgico foi observado. Apresentou melhoria no desempenho, sobrevivência e colonização do microbioma intestinal. Atuando como imunoestimulante e promotor de crescimento. Os alimentos funcionais aqui testados apresentam-se como potencial alimento funcional para a tilápia do Nilo.

Palavras-chave: extrato, óleos essenciais, prebiótico, probiótico, simbiótico, aquicultura, desafio, microbiologia.

ABSTRACT

Fish farming has been outstanding with its accelerated growth. The high demand in activity resulted in environmental damage and low productivity. Due to this framework, the need arises to improve disease resistance, growth rates and better use of the diet provided, and brought the use of alternatives to antimicrobials in aquaculture practices. With this principle, the present study aimed to evaluate the effects of the use of natural additives such as growth promoters and immune stimulants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through health challenges with *Aeromonas hydrophila*. Therefore, we tested the ethanol extract of propolis (EEP), oregano essential oil (OEO), *Saccharomyces cerevisiae* (probiotic), *Ascophyllum nodosum* (prebiotic) and a symbiotic (together the same pre- and probiotics) in feeds for tilapia. The research consisted of five experiments "in vivo". Such experiments were carried out in the Laboratory of Microbiology and Immunology Animal UNIVASF, as well as isolate used was from the bacteriotecca this laboratory. Fingerlings of Nile tilapia fed pelleted feed, manufactured exclusively for the studies in question. Environmental conditions for the animals were kept in the appropriate limits for the species, except for the probiotic of the experiment (*S. cerevisiae*), which was also used as a stress factor. After 30 days of feeding were performed the challenge with *A. hydrophila*. At the end of the experiments, the fingerlings were evaluated for the zootechnical, survival, immunological and microbiological parameters. In the experiment with the EEP, it was found that did not influence the survival parameters, performance and carcass yield of fingerlings, but contributed to the recovery of the lesions caused by *A. hydrophila*, it was also observed a greater diversity in the intestinal microbiome by PCR-DGGE. In the choice of essential oil, a test was performed "in vitro" to evaluate antimicrobial activity against 100 isolates of *A. hydrophila*: Oregano (*Origanum vulgare*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and black pepper (*Piper nigrum*). The OEO showed the best activity and, when tested "in vivo", the dose and 0.5% and 1 kg feed⁻¹, were associated with better performance parameters. The OEO also contributed to a greater diversity of intestinal microorganisms. In experimenting with the probiotic their doses were chosen from recommendations provided by the manufacturer, this amendment caused changes in the intestinal microbiome and the level of 6×10^8 CFU kg⁻¹ *S. cerevisiae* had better effect on performance in the same food use fish under stress conditions. A *A. nodosum*, although their performance and survival values were higher than the control group, they showed no significant difference, but the additive contributed to a better colonization of yeast in the intestines of young fish in the control group. When the union to probiotic (symbiotic), a synergistic effect was observed. Showed improved performance, survival and colonization of the intestinal microbiome. Acting as immunostimulant and growth promoter. The here tested functional foods are presented as a potential functional food for Nile tilapia.

Keywords: extract, essential oils, prebiotic, probiotic, symbiotic, aquaculture, challenge, microbiology.

1. INTRODUÇÃO

Em função do crescimento e das mudanças nos hábitos alimentares da população, que busca por melhorias na qualidade de vida, a produção de organismos aquáticos tem sido estimulada. Comprovados pelos dados da FAO (2014), a oferta mundial de pescado *per capita* aumentou de uma média de 9,9 kg (equivalente peso vivo) na década de 1960 para 19,2 kg em 2012. Dados preliminares para 2011 indicam que o consumo de peixe continuou a aumentar, atingindo 18,8 kg¹. Alguns países da América do Sul, como Equador, Peru e Brasil, já fizeram um rápido progresso para tornarem-se produtores de grande importância na aquicultura. Neste cenário, o Brasil ocupa a 12^o posição no ranking mundial, com 479.399 t em 2010 (MPA, 2012). Em 2011, a região Nordeste registrou a maior produção de pescado do país, respondendo por 31,7% da produção nacional (MPA, 2012).

Acompanhando a tendência, o Vale do São Francisco possui grande tradição na pesca e produção de peixes. Atividade esta realizada tanto em criatórios associados a modernas tecnologias de produção como por pequenos produtores rurais e famílias de pescadores. O cultivo de espécies exóticas como a tilápia do Nilo vem se destacando e tem representado uma alternativa importante para a região, pois apresenta um pacote tecnológico de cultivo avançado, ótima adaptação ao cultivo em cativeiro. Além de seus favoráveis fatores de criação e desempenho, a tilápia apresenta excelente qualidade de carcaça já bem reconhecida e aceita pelo mercado consumidor.

A intensificação dos criatórios de peixes, hoje é reconhecidamente um sistema de elevada produtividade, embora estressante, em função de altas densidades de estocagem, alto fluxo de água e manejos decorrentes de classificação e transportes (El-Sayed, 2006). Tais fatores estressantes são as principais causas de perdas na piscicultura, pois afetam o metabolismo, diminuem a atividade do sistema imune e conseqüentemente, o crescimento e a sobrevivência dos peixes (Hussain, 2004). A *A. hydrophila* é mais frequente do que as outras espécies de *Aeromonas* no desenvolvimento de doenças nos peixes, sendo que esta também reúne os isolados de maior virulência (Pavanelli et al., 2008). Fato este também confirmado em trabalhos realizados na região do Submédio São Francisco (Silva, 2011; Santos, 2011).

As doenças bacterianas são comumente combatidas pela adição de quimioterápicos e antibióticos nas dietas. A utilização de doses sub-terapêuticas como promotores de crescimento, são uma prática também aplicada na produção animal (Dibner e Richards, 2005). Entretanto, seu uso indiscriminado, tem levado ao desenvolvimento de cepas de organismos múltiplo resistentes (Kaskhedikar e Chhabra, 2009), o que é muito preocupante, pelo fato de

serem fármacos utilizados na clínica (Wang e Silva, 1999; Schmidt et al., 2001; Vivekanandhan et al., 2002). O que pode tornar difícil de curar as doenças causadas por *A. hydrophila* (Daskalov, 2006).

O óleo essencial de orégano (OEO) e o extrato de própolis destacam-se por serem produtos naturais, com potencial uso zootécnico, assim como o uso de bactérias consideradas probióticas. O orégano é bem conhecido em todo o mundo pelo seu especial aroma e por suas propriedades antioxidantes e qualidades antimicrobianas (Gabor et al., 2010). As principais substâncias ativas de orégano são timol e carvacrol (Cáceres, 1999). O óleo de orégano vem sendo utilizado em dietas (Zheng et al., 2009; Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn, 2010; Ahmadifar et al., 2011), com efeitos positivos.

O extrato de própolis é um produto constituído por uma mistura de diversas resinas vegetais, que é coletado por abelhas em plantas comumente visitadas por estes insetos (Azza et al., 2009). Seus principais componentes são os compostos fenólicos (Sforcin, 2007). Tais propriedades são caracterizadas como antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiprotozoário, anti-inflamatório e imunoestimulante (Bankova, 2000). A própolis tem sido objeto de crescente interesse, em função da sua notável atividade biológica (Sforcin, 2007), amplamente utilizada como um promotor de crescimento (Denli et al., 2005; Meurer et al., 2009), um adjuvante (Wang et al., 2000; Cai et al., 2001), ou um imunoestimulante para peixes (Cuesta et al., 2005; Chu, 2006; Abd- El-Rhman, 2009; Talas e Gulhan, 2009).

A *Saccharomyces cerevisiae* é um micro-organismo que pode ser utilizado como probiótico na aquicultura (Abdel-Tawwab, 2012) e tem apresentado efeito positivo contra problemas intestinais provocados por uma série de micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* entre outros, além da estimulação do sistema imunológico (Abu-Elala et al., 2013; Schroeder et al., 2004). Herek et al. (2004) concluíram que a *Saccharomyces boulardii* é capaz de proteger o balanço da flora gastrintestinal pela inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas, auxiliar o crescimento de bactérias anaeróbicas e aumentar a resposta imunológica do hospedeiro.

Nessa mesma linha de estudo, os aditivos prebióticos também vem ganhando destaque, dentre eles a farinha da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, que é encontrada nas águas costeiras do Norte do Oceano Atlântico (Branden et al., 2007). Em sua composição, apresenta carboidratos funcionais (Berteau e Mulloy, 2003), com efeito positivo no uso em rações para peixes (Costa et al., 2013; Oliveira et al., 2014). A combinação da *S. cerevisiae* com a *A. nodosum* como proposta de simbiótico é uma pesquisa inédita. Em função de suas

respostas positivas de forma isolada em animais aquáticos, os resultados dessa união são promissores e estimulantes.

A nutrição precisa se adaptar a esses novos desafios, por meio do desenvolvimento de novos conceitos e de estratégias. Aditivos que promovam a saúde, uma nutrição otimizada, que afete benéficamente uma ou mais funções-alvo no corpo, como os denominados "alimentos funcionais", adicionados às dietas dos animais (Roberfroid, 2002). Conceitos novos e relevantes não somente para evitar surtos epizooticos, como para promover melhores índices zootécnicos e, em consequência, econômicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura

O Brasil é um país de grande extensão territorial, possui a maior reserva de água doce do globo com cerca de 8 mil km³. Embora 85% do território esteja localizado em zona de clima tropical, muito favorável à produção de pescados, o potencial destes recursos ainda é pouco aproveitado para o incremento da produção aquícola (BNDES, 2012). Contudo, o Brasil tem melhorado sua posição global significativamente nos últimos anos.

A produção de peixes continental está num patamar constante a mais de dez anos, enquanto que a produção da aquicultura aumentou substancialmente. Segundo IBGE (2013) a produção aquícola brasileira foi de 477 mil toneladas com uma taxa de crescimento de 56% nos últimos 12 anos, movimentando cerca de 3 bilhões ao ano, sendo a piscicultura responsável por 82% da produção nacional. Através dos índices do consumo, de 1999 a 2011 a média *per capita* passou de 6,15 kg/habitante/ano para 11,17 kg/habitante/ano, um aumento de 81% (MPA, 2012). O principal fator relacionado a esse crescimento, se dá pelo aumento da produtividade em cativeiros atrelados ao viés da “alimentação saudável”, impulsionados pela oferta de novos produtos e difusão de culinárias (SEBRAE, 2015). Dessa forma é possível prescrever a crescente valorização que está sendo dada atualmente a essa fonte de alimento.

Globalmente, o Brasil encontra-se entre os 15 países responsáveis pela produção de 92,7% de todo pescado cultivado em 2012 (FAO, 2014). A região Nordeste do país, destaca-se como o maior produtor (29% da produção nacional) principalmente em virtude da carcinicultura. Os principais grupos cultivados, são os peixes ósseos (FAO, 2014). As espécies de peixes redondos e as tilápias representam 83% do cultivo de peixes no país,

estando às últimas contribuindo atualmente com 47% da produção, com índices de crescimento de 105% (IBGE, 2013).

A viabilidade da piscicultura depende da disponibilidade de espécies adaptadas ou adaptáveis aos sistemas de produção (Ostrensky et al., 2008). Na região semiárida do Nordeste, apesar das baixas taxas pluviométricas, a piscicultura tem sua importância devido à existência de alguns rios e barragens, tornando-se alternativa de atividade econômica e social (Meurer et al., 2009). Devido às tecnologias para o cultivo, melhoramento genético e profissionais capacitados existentes, aliados às condições climáticas e boas características de solo da região, o cultivo de espécies exóticas, como a tilápia do Nilo, tem se destacado, tornando-se uma alternativa importante para o desenvolvimento de pisciculturas de pequeno e grande porte (Oliveira, 2011).

Dentre os sistemas de cultivo de peixes, a atividade em tanques-rede se destaca no país, pois apresenta baixo custo e fácil manejo. Entretanto, este tipo de sistema de produção de peixes pode causar consequências negativas nos ecossistemas aquáticos modificando a qualidade da água e conseqüentemente afetando a qualidade do pescado produzido (Américo et al., 2013). Neste tipo de criação a espécie mais utilizada é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), devido a suas características biológicas e ecológicas que lhe confere alta tolerância às condições adversas além de ser uma espécie com melhor aceitação pelo mercado consumidor (Kubitza, 2000).

As tilápias do Nilo foram introduzidas no Nordeste do país no início dos anos 1970, desde então, essa atividade vem tendo elevada difusão. Podem ser produzidas em sistemas extensivos ou semi-intensivos de cultivo, mas a viabilidade da tilapicultura é muito maior quando a espécie é produzida em sistemas intensivos a partir de alimentos completos, extrusados e altamente digestíveis (Fracalossi e Cyrino, 2012). No entanto, a intensificação das práticas na piscicultura requer um cultivo em altas densidades, nos quais os peixes são submetidos a altas condições de estresse (Cruz et al., 2012). Uma problemática acerca do cultivo de peixes está diretamente relacionada aos efluentes que podem poluir as águas naturais, pois podem conter concentrações de variáveis biológicas e químicas acima do permitido, aumento direto dos sólidos suspensos e nutrientes oriundos do alimento não consumido pelos peixes, excrementos e subprodutos metabólicos (Meirelles, 2010).

O manejo da adubação e alimentação de peixes em tanques-rede pode afetar diretamente a qualidade da água, causando perda progressiva da biodiversidade e rendimento dos produtos. O cultivo dos peixes é mantido por fatores físicos e químicos complexos e por interações biológicas que dependem diretamente da qualidade da água (Konsowa, 2007).

Dessa forma, qualquer desequilíbrio no ambiente aquático pode desencadear uma resposta fisiológica de estresse nos indivíduos, que de acordo à duração e tipo de manejo pode levar a uma alteração do sistema imunológico, diminuindo sua capacidade de reagir a patógenos, tornando-os mais sensíveis a enfermidades, principalmente as de origem bacteriana, com consequente aumento nas taxas de mortalidade e prejuízos à produção (Sado e Matushima, 2007).

Dentre as doenças que afetam o cultivo de peixes, predominam as de origem bacteriana, entretanto nem todas as bactérias são patógenos primários, podendo ser caracterizados como patógenos oportunistas, que colonizam e causam doenças em hospedeiros imunossuprimidos (Austin e Austin, 2007). As doenças mais comuns observadas em cultura de tilápias do Nilo são as causadas pelas espécies de bactérias *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae* (Komar, 2008; Figueiredo e Leal, 2008). Na Região do Vale do São Francisco, *Aeromonas hydrophila* é a espécie mais comumente isolada e identificada de organismos aquáticos (Silva, 2011; Santos, 2011), o que é preocupante, pois dentre as *Aeromonas* móveis, os isolados de *A. hydrophila* são considerados os mais virulentos (Fang et al., 2004; Costa, 2003). Acredita-se que a sua patogênese de infecção é complexa e multifatorial, possuindo envolvimento de diversos fatores de virulência (Yu et al., 2005; Pablos et al., 2009).

A piscicultura contemporânea é apontada como um mercado estratégico para o desenvolvimento sustentável, produção de alimentos e ampliação de fronteiras inexploradas no Brasil (Figueiredo e Leal, 2008). Fazendo parte desse contexto, o Semiárido nordestino já se destaca na atividade, e a tilápia do Nilo é a espécie mais explorada. Para a prevenção de doenças e consequente diminuição de perdas econômicas além das práticas de manejo como controle da qualidade da água, cumprimento de quarentena quando novos lotes forem introduzidos, alimentação balanceada (Tavechio et al., 2009), destacam-se ainda, a necessidade de encontrar alternativas, que visem estimular do sistema imune e favorecer o desempenho dos animais, sem com isso, trazer um consequente aumento da resistência a doença, riscos significativos para a saúde pública, promovendo a seleção, propagação e persistência de cepas bacterianas resistentes. A nutrição otimizada é um dos novos conceitos, dirigida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida. As propostas são muitas, dentre elas prebióticos, probióticos, simbióticos, extratos de plantas e óleos essenciais.

2.2 Antimicrobianos em piscicultura

Visando atender à crescente demanda por alimentos, a prevenção, o controle de doenças e a melhoria na eficiência alimentar dos animais tem se utilizado aditivos químicos e medicamentos veterinários, principalmente antibióticos (Allem et al., 2013). Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos utilizados nas diversas áreas de produção animal para prevenção e tratamento de enfermidades infecciosas. Em piscicultura, grande parte das doenças que prejudicam o cultivo são causadas por agentes infecciosos, desta forma, o uso de antimicrobianos é uma prática de controle rotineiramente utilizada para conter a mortalidade excessiva dos peixes (Gastalho et al., 2014).

Na aquicultura, os antimicrobianos são classificados como terapêuticos, profiláticos e metafiláticos. O uso terapêutico corresponde ao tratamento de infecções já estabelecidas, enquanto o uso profilático envolve a administração de agentes antimicrobianos como forma de prevenção em indivíduos ou grupos para impedir o desenvolvimento de infecções. A utilização metafilática, corresponde ao procedimento que visa tratar os animais doentes e simultaneamente trata os outros animais que se encontram sãos, de forma a evitar a disseminação da doença. Geralmente os produtos são administrados terapêuticamente por via oral e por tempo reduzido, exceto em unidades reprodutoras, em que se utiliza a via intraperitoneal (Romero et al., 2012).

A administração de antimicrobianos por meio da ração e terapia de imersão, em que o produto é adicionado diretamente na água, pode transferir grande quantidade desses produtos para o ambiente, impactando negativamente o microbioma relevante presente na água (Heuer et al., 2009). O problema é que, concomitante ao seu uso em criatórios, foram isoladas bactérias resistentes. De acordo com Lutzhoft et al. (1999), dos antimicrobianos utilizados nos cultivos de peixes, por meio da alimentação, poucos são absorvidos em sua totalidade, principalmente em grupos de animais enfermos, em que ocorre redução da ingestão do alimento. Dentre as drogas administradas, 70% a 80% possuem capacidade de atingir o meio ambiente contaminando ecossistemas terrestres e aquáticos. Estudos tem contribuído em demonstrar tal impacto ambiental próximos a cultivos aquícolas, expondo uma eleva disseminação de genes de resistência bacteriana a antibióticos (Shimidt et al., 2000; Sorum, 2000; Sorum, 2006).

A resistência aos antibióticos pode ser adquirida por mutação cromossômica ou aquisição de plasmídeos (Cruz et al., 2012). As bactérias que inevitavelmente desenvolvem resistência aos antibióticos em animais compreendem agentes patogênicos de origem

alimentar, patógenos oportunistas e bactérias comensais (Tueber, 2001). Nesse contexto, os micro-organismos do gênero *Aeromonas* compreendem os patógenos de maior importância em piscicultura, sendo a etiologia da maioria das infecções, apesar de serem consideradas bactérias patogênicas facultativas e oportunistas, se manifestando em indivíduos enfraquecidos por concomitantes infecções bacterianas, virais, parasitárias ou em detrimento de desequilíbrios nutricionais (Pavanelli et al., 2008). São encontradas em diversos habitats, no intestino dos peixes, água e sedimentos de lagos ricos em matéria orgânica (Trombetta et al., 2005) e distribuídas nas espécies patogênicas para peixes: *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. sobri*, *A. caviae*, *A. allosaccharophila* e *A. salmonicida* (Austin e Austin, 1987). A *A. hydrophila* é um bastonete móvel Gram-negativo, que se destaca por causar septicemia hemorrágica em peixes, caracterizada por lesões superficiais e hemorragias focais, exoftalmia e lesões internas como ascite, lesões necróticas hepáticas e renais (Austin e Austin, 1987; Chandran et al., 2002). Em seres humanos a *A. hydrophila* é considerada importante agente etiológico de gastroenterites oriundas do consumo de alimentos contaminados (Kozinska e Pekala, 2010).

Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization), a regulamentação para o uso de antibiótico em cultivos de peixes é definida por cada país, ou por acordos diplomáticos, a exemplo da comunidade europeia. No Brasil, o uso de antimicrobianos em aquicultura é restrito, compreendendo poucos princípios ativos, entre eles o florfenicol e oxitetraciclina, contudo, devido à fiscalização ineficiente outros produtos são utilizados indiscriminadamente (Carrashi et al., 2011).

As enfermidades bacterianas são responsáveis pela diminuição da produtividade, sendo um fator limitante de crescimento principalmente em sistemas de cultivo intensivo. O uso de antimicrobianos de forma indiscriminada na piscicultura para a prevenção e controle de doenças infecciosas ou como promotores de crescimento amplia a pressão da seleção sobre os micro-organismos, com consequente elevação da resistência bacteriana. O desenvolvimento e propagação da resistência antimicrobiana tornou-se uma problemática de saúde pública mundial (FAO / OIE / OMS, 2006), pois a mesma não respeita fronteiras geográficas e ecológicas, por exemplo, o uso de drogas em aquicultura, pode causar impacto sobre outra área, como na medicina humana, pois bactérias de ambientes aquáticos podem infectar seres humanos, caracterizando uma dispersão direta da resistência entre espécies (Cabello, 2004).

A preocupação com a presença de resíduos de drogas antimicrobianas nos alimentos oriundos da aquicultura é destacada pelas regulamentações existentes sobre o uso das

mesmas, com o estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMR). O Brasil adota os LMR para produtos veterinários recomendados pelo Mercosul, Codex Alimentarius, União Européia ou Estados Unidos (Pacheco-Silva et al., 2014).

Os micro-organismos associados a doenças características de peixes geralmente são as variantes mais resistentes, demonstrando a importância do uso ponderado e responsável de antibióticos na rotina da atividade produtiva, pois o contrário causará um impacto direto em futuros tratamentos a serem instituídos (Smith, 2008). Por isso há a necessidade de estudos no sentido de encontrar substitutos que possam trazer benefícios à saúde dos peixes, sem deixar resíduos no alimento e no ambiente.

2.3 Alternativas ao uso de antibióticos em piscicultura

A piscicultura intensiva está em constante crescimento, entretanto aliado a isso ocorre o aumento da incidência de enfermidades. A antibioticoterapia, principal forma de prevenção e tratamento, tem se tornado uma medida limitante, visto que seu uso massivo possibilita a seleção de micro-organismos resistentes (Andrade et al., 2012). Hirsch et al. (2006) estudando a resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes demonstraram que é grande a diversidade de espécies da bactéria em ambientes de piscicultura e que diversos isolados se apresentam resistentes às drogas antimicrobianas, mesmo sem o uso de tais substâncias para o controle de enfermidades infecciosas.

Diante desta problemática, a busca por alternativas ao uso de drogas antimicrobianas vem sendo primordial, uma vez que esse uso representa um risco potencial para a saúde pública, pois geram resíduos na carne (Barani e Fallah, 2014) e transmitem bactérias resistentes ao meio ambiente, animais e homem (Schmidt et al., 2000). A prática da nutrição otimizada vem ganhando espaço e força no sentido de estimular o sistema imunológico dos peixes, garantindo não somente os critérios nutricionais, mas também levando em conta a saúde (Kiron, 2012). Dentre as estratégias nutricionais utilizadas estão os alimentos funcionais, considerados como alimento ou constituinte alimentar, com capacidade de maximizar funções fisiológicas, tendo efeito relevante sobre o bem-estar e saúde (Day et al., 2009). Como alimento funcional podemos citar os imunostimulantes, considerados aditivos zootécnicos, os quais sustentam a hipótese de que modulam várias funções como o sistema imune, amenizando fatores de estresse de produção e aumentando a resistência dos animais contra infecções por patógenos (Bricknell e Dalmo, 2005).

Como alternativas para as drogas convencionais, diversos estudos têm demonstrado papel significativo para aquicultura, como o uso de plantas medicinais (extratos, óleos essenciais), prebióticos, probióticos e simbioses, que atuam como profiláticos e terapêuticos contra agentes patogênicos de peixe, apresentando potencial antiviral, antibacteriano, antifúngico e antiparasitário, minimizando as perdas econômicas resultantes dessas infecções (Citarasu, 2010; Park et al., 2011). Sabe-se que o controle das infecções causadas por *A. hydrophila* está ligado ao controle de fatores que facilitam a invasão do hospedeiro.

Óleos essenciais e extratos de plantas contém uma rica mistura de moléculas altamente funcionais, algumas das quais são benéficas e outras tóxicas. No entanto, no ambiente, esta toxicidade é muito baixa em comparação com aquelas de pesticidas sintéticos ou drogas (Park et al., 2011). Sutili et al. (2015), constataram atividade “*in vitro*” e “*in vivo*” do óleo essencial de erva cidreira (*Lippia alba*) contra *Aeromonas* spp. No ensaio “*in vivo*”, a sobrevivência foi de 90% em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) tratados após desafio, apresentando lesões típicas associadas à infecção por *Aeromonas* spp.

Produtos de origem vegetal bastante estudado é o extrato da própolis, elaborado de forma natural pelas abelhas (*Apis mellifera*) para vedar aberturas e controlar microorganismos em suas colônias (Cueto, 1989). Estas coletam resinas das plantas, que contém elevada qualidade antimicrobiana e imunológica, tem sido indicado aos peixes (Meurer et al., 2009; Talas e Gulahn, 2009), pelas suas inúmeras propriedades benéficas e ainda por ser de fácil obtenção (Soares et al., 2006; Tavares et al., 2006).

Estudos tem sido realizado com finalidade de esclarecer o efeito dos extratos de própolis contra *Aeromonas* spp., afim de utilizá-la como alternativa antimicrobiana na produção aquática. Andrade et al. (2012) avaliaram “*in vitro*” a sensibilidade de *Aeromonas hydrophila* frente a extratos etanólicos de própolis e observaram que a curva de sobrevivência dos isolados testados demonstrou uma inibição parcial com até três horas de incubação, resultado compatível com o efeito bacteriostático da própolis, podendo ser alternativa às poucas drogas antimicrobianas disponíveis para a terapia em aquicultura. Em estudo “*in vivo*” com a truta arco-íris, a partir da administração do extrato de própolis em dietas contendo 0,0; 0,5; 1,5; 4,5 e 9,0 g de própolis/kg ração, Kashkooli et al. (2011) puderam concluir que os peixes não apresentaram sinais de toxidez a longo prazo. Deng et al., (2011) também trabalhando com a mesma espécie, observaram que o extrato etanólico de própolis atuou como promotor de crescimento, agente hepatoprotetor e imunoestimulante. Nessas condições, os estudos com esse aditivo são válidos e promissores.

O óleo essencial de orégano (OEO) apresenta efeitos benéficos, possuindo principalmente características antimicrobianas. Essas características são confirmadas por Starliper et al., (2014) em um procedimento “in vitro” em que concluíram uma excelente atividade antimicrobiana frente *Aeromonas* spp.. Estudos tem mostrado que o principal componente do OEO é o carvacrol (Ekren et al., 2013) e que pode estar ligado ao efeito antimicrobiano e antioxidante, sendo este, observado a nível celular por Bakkali et al. (2008).

Na alimentação de peixes, o OEO também vem sendo testado e apresentando resultados positivos no crescimento, conversão alimentar e parâmetros imunológicos (Zheng et al., 2009; Ahmadifar et al., 2011), como também na sobrevivência conta infecções por bactérias (Zheng et al., 2009; Rattanachaiakunsopon e Phumkhachorn, 2010)

Ainda como alternativa ao uso de antibióticos, aumentou o número de pesquisas com alimentos funcionais e de substâncias que promovam o aumento da eficiência alimentar e da taxa de crescimento dos peixes (Oliveira et al., 2002). Nesse contexto, os probióticos, prebióticos e simbioses são promotores de vida no sentido que melhoram de maneira geral o estado de saúde do organismo receptor (Brito et al., 2013).

Probióticos são organismos vivos que quando administrados em doses adequadas, podem melhorar a vida animal (Fuller, 1989) e quando utilizados para organismos aquáticos apresentam efeitos benéficos, não só nos animais, mas também no ambiente de criação (Cruz et al., 2012), por meio da melhoria da qualidade da água. Sabe-se, portanto, que os micro-organismos na água influenciam no microbioma do intestino dos animais e vice-versa, contudo a interação entre ambiente e hospedeiro no ecossistema aquático ainda é complexa (Verschuere et al., 2000).

Vale salientar que os probióticos não apresentam efeitos bactericidas diretamente, mas sim de competição com as bactérias, inibindo seu desenvolvimento e contribuindo para o equilíbrio biológico (Balcázar, 2002). Estudos têm apontado que os probióticos na dieta de peixe e água de criação melhoraram a resistência à colonização por bactérias patogênicas (Irianto e Austin, 2002, Capkin e Altinok, 2009; Gaggia et al., 2010), o crescimento e a utilização de nutrientes (Merrifield et al., 2010). As *Saccharomyces cerevisiae* são leveduras, e seu uso como imunoestimulante vem sendo bastante promissor (Lara-Flores et al., 2003, Abdel-Tawwab et al., 2008; He et al., 2009; Reque et al., 2010; El-Boshy et al., 2010).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que de forma seletiva, afetam benéficamente o hospedeiro por estimular/alterar o microbioma do cólon, aumentando o número de bactérias específicas (Gibson e Roberfroid, 1995; Amlashi et al., 2011). Estes são hidratos de carbono que podem ser classificados de acordo com o tamanho molecular ou

grau de polimerização, tais como monossacáridos, polissacáridos ou oligossacáridos (Roberfroid, 2001). Utilizado na ração de peixes, *Ascophyllum nodosum* pode ser considerado um prebiótico, já que apresenta elevado teor de polissacarídeos não amiláceos, oligossacarídeos e outros não carboidratos, principalmente os ácidos algínicos, manitol e lamarina (Bertheau e Mulloy, 2003), com efeito positivo no sistema imunológico (Costa et al., 2013; Oliveira et al., 2014).

Por fim, a combinação de probióticos e prebióticos, em uma mesma ração, é chamada de simbiótica (Collins e Gibson, 1999), que são combinados no intuito de melhorar os seus efeitos benéficos, em consequência podem ter a capacidade de melhorar as atividades em um mecanismo específico de defesa, aumentando a resistência a doenças infecciosas, e indiretamente causando aumento na produção aquática (Amlashi et al., 2011). O uso de simbióticos em piscicultura tem sido pouco investigado e os dados disponíveis ainda são escassos. Vários são os fatores a serem levados em conta a despeito das propriedades dos simbióticos para seu real potencial na aplicação em piscicultura; tais como, a espécie de peixe, o tempo de fornecimento na alimentação e quantidade suplementar, bem como o tipo de prebióticos e probióticos utilizados. Esse conjunto de fatores, pode compor significativamente a atividade dos simbióticos (Cerezuela et al., 2011).

Em termos de crescimento, muito dos estudos relatam um efeito positivo do uso de simbióticos em aquicultura, com padrões de sinergismo ou potenciação (Rodriguez-Estrada et al., 2009; Zhang et al. 2010; Ai et al., 2011; Geng et al., 2011; Mehrabi et al., 2012; Ye et al., 2011). Em contrapartida Cerezuela et al. (2012) verificaram que, a administração combinada inulina (prebiótico) + *Bacillus subtilis* (probiótico) aumenta a susceptibilidade à infecção por *Photobacterium damsela subsp. Piscicida*.

São de extrema importância pesquisas voltadas na busca de alternativas ao uso de quimioterápicos. Além de garantir segurança alimentar e ambiental, os efeitos positivos no desempenho dos peixes, sobrevivência, parâmetros imunes garantem uma maior sustentabilidade de produção. Aplicar a melhor estratégia de alimentação pode ter um impacto significativo para otimizar lucros de produção, que é o principal objetivo da aquicultura comercial. Além disso, quanto menor é o índice de mortalidade desde as fases iniciais até o abate, os custos subsequentes de produção seriam reduzidos drasticamente (Cerezuela et al., 2011). Uma das propostas relevantes, é que essas substâncias sejam suplementadas nas dietas em momentos críticos para os peixes, como nas práticas de manejo e na fase inicial de crescimento (Kiron, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do uso de alimentos funcionais, como promotores de crescimento e imunoestimulantes, em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio de desafios sanitários com *Aeromonas hydrophila*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da inclusão do extrato de própolis, como alimento funcional à ração, sob o desafio com *A. hydrophila*;
- Investigar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos óleos essenciais de orégano (*O. vulgare*), alecrim (*R. officinalis*) e da pimenta negra (*P. nigrum*);
- Avaliar a adição de níveis de óleo essencial de orégano, sob o desempenho, a resposta imune e a resistência contra *A. hydrophila* em tilápias do Nilo;
- Avaliar as respostas quanto ao desempenho e imunológicas de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com doses crescentes do probiótico *S. cerevisiae* desafiados com *A. hydrophila*.
- Investigar o uso de óleo essencial de orégano e extrato etanólico de própolis como alimento funcional frente a *A. hydrophila*, na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo.
- Avaliar o efeito potencial da administração dietética da alga marinha *A. nodosum* e da levedura *S. cerevisiae*, separadamente e combinados, para alevinos de tilápia do Nilo, sobre os parâmetros de desempenho e carcaça, microbiota intestinal e resistência a desafio com *A. hydrophila*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-RHMAN, A.M.M. (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immun.* 27: 454–459.
- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A.; ISMAEL, N.E.M. (2008). Evaluation of commercial live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture.* 280: 185-189.
- ABDEL-WARETH, A.A.A.; KEHRAUS, S.; HIPPENSTIEL, F.; SÜDEKUM, K.H. (2012). Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers – Short communication. *Animal Feed Science Technology.*, 178: 198 -202,
- ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. (2013). Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* 1: 21–29,
- AHMADIFAR E., FALAHATKAR B., AKRAMI R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Ichthyol.* 27(4): 1057-1060.
- AI, Q.; XU, H.; MAI, K.; XU, W., WANG, J., ZHANG, W. (2011). Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, 317: 155-61.
- ALLEN, H.K.; LEVINE, U.Y.; LOOFT, T.; BANDRICK, M.; CASEY, T.A. (2013). Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in Microbiology*, 21(3): 114-119.
- AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; MACHADO, A. A.; CARVALHO, S. L. de. (2013). Piscicultura em Tanques-Rede: Impactos e Consequências na Qualidade da Água. *Revista Científica ANAP Brasil.* 6(7):137-150.
- AMLASHI, A. S.; FALAHATK, B.; SATTARI, M.; GILANI, M.H.T. (2011). Effect of dietary vitamin e on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of ub-yearling beluga *Huso huso* L, *Fish Shellfish Immunol.* 30(3):807-814.
- ANDRADE, N.P.C.; SILVA, E.M.S.; MOTA, R.A.; VESCHI, J.L.A.; RIBEIRO, M.F.; KREWER, C. C.; COSTA M.M. da. (2012). Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. *Arq. Inst. Biol.* 79(1):9-15.
- AUSTIN, B.; AUSTIN D. A. 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases in Farmed and Wild Fish*, Chichester, Ellis Horwood, 552
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. (1987). *Fish pathogens diseases in farmed and wild*. Chichester, UK : Ellis Horwood, 196-224.
- AZZA, M.M.; ABD-EL-RHMAN. (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3):454-459.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
- BALCÁZAR, J.L. (2002). Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In: de Blas, I. (Ed.), *Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, Zaragoza, Spain, pp. 877–881.
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Review article. *Apidologie.* 31: 3–15.
- BARANI, A.; FALLAH, A.A. (2014). Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones and florfenicol in farmed rainbow trout in Iran. *Food and Agricultural Immunology.* 26(3): 420-429.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology.* 13(6):29-40.

- BNDES. (2012). Agroindústria Setorial. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. 35:421-463.
- BRANDEN, K.W.; BLANTON, J.R.; MONTGOMERY, J.L.; VAN SANTEN, E.; ALLEN, V.G.; MILLER, M.F. (2007).Tasco supplementation: Effects on carcass characteristics, sensory attributes, and retail display shelf-life. *J. Anim. Sci.* 85: 754-768.
- BRASIL - MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf Acesso: 20/09/2014.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*, 19: 457–472
- BRITO, J.M.A.; FERREIRA, H.C.; SANTANA JÚNIOR, H.A.; ARARIPE, M.N.B.A.; LOPES, J.B.; DUARTE, A.R.; CARDOSO, E.S.; RODRIGUES, V.L. (2013). Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes – Revisão. *Revista eletrônica nutritime (www.nutritime.com.br)*. 205(10), n. 04: 2525 – 2545.
- CABELLO, F.C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev Méd Chile*, 132: 1001-1006.
- CÁCERES, A. (1999). Plantas de uso medicinal in Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 402.
- CAI, J.L.; TANG, X.L.; YANG, L.F.; SU, X.Y. (2001). Propolis inactivated vaccine against infectious serositis in young ducks. *Chin J Vet Sci*, 21: 552–553.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1147–1153.
- CARRASCHI, S.P.; Cruz, C.; MACHADO NETO, J.G.; CASTRO, M.P.; BORTOLUZZI, N.L. Gírio, A.C.F. (2011). Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63(3):579-583.
- CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F.A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.Á. (2012). Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 1032-1040.
- CEREZUELA, R.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. (2011). Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: A Review. *Aquaculture Research & Development*.
- CHANDRAN, M.R.; ARUNA B.V.; LOGAMBAL, S.M.; MICHAEL, R.D. (2002). Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. *Fish & Shellfish Immunology*. 13: 1-9.
- CHU, W.H. (2006). Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish & Shellfish Immunology*. 21: 113–117.
- CITARASU, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult. Int.* 18:403-414.
- COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. 69:1052S-1057S.
- COSTA, A. B. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. (2003). 54 p. Tese de doutorado (Pós-Graduação de Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2003.
- COSTA, M.M.; OLIVEIRA, S.T.L.; BALEN, R.E.; BUENO JUNIOR, G.; BALDAN, L.T.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D. (2013). Brown seaweed meal to Nile tilapia fingerlings. *Archivos de Zootecnia*, 62(237): 109.
- CRUZ, P.; IBÁÑEZ, A.L.; HERMOSILLO, O.A. M.; SAAD, H.C.R. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network (ISRN Microbiology)*, Article ID 916845, p. 13.
- CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.Á.; MESEGUER, J. (2005). *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 71-80.
- CUETO, D.J. (1989). Experiência clínica de los medicamentos elaborados com propoleo. In: ASIS, M. (Ed.). *Investigaciones cubanas sobre el propóleos*. Memórias del 1º Simpósio sobre los efectos del

- propoleo em la salud humana y animal. (1988). Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba,
- DASKALOV, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17: 474–483.
- DAY, G., BRINKMANN, D.; FRANKLIN, S.; ESPINA, K.; RUDENKO, G.; ROBERTS, A.; HOWSE, K.S. (2009). Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55:166–180.
- DENG, J.; AN, Q.; BI, B.; WANG, Q.; KONG, L.; TAO, L.; ZHANG, X. (2011). Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem*, 37:959–967.
- DENLİ M.; CANKAYA S.; SILICI S.; OKAN F.; ULUOCAK A.N. (2005). Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Asian-Aust Journal Animal Science*. 18: 848–854.
- DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, Champaign, 84, 634-643.
- EKREN, S.; YERLIKAYA, O.; TOKUL, H.E.; AKPINAR, A.; AÇU, M. (2013). Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7(5): 383-388.
- EL-BOSHY, M.E.; EL-ASHRAM, A.M.; ABDELHAMID, F.M.; GADALLA, H.A. (2010). Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28: 802-808.
- EL-SAYED, A.M. (2006). Tilapia culture. CABI Publishing, Oxford, 277.
- FANG, H.M.; GE, R.; SIN, Y.M. (2004). Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 16. p. 645-658.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014: Oportunidades y desafíos (in Spanish). Food and Agriculture Organization of United Nations, Roma. p. 274.
- FAO/OIE/OMS. (2006). Expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance : Seoul, Republic of Korea, 13-16.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. (2008). Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, p.08-14.
- FRACALOSSİ, D.M.; CYRINO, J.E.P. (2012). Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 375.
- FULLER, R. (1989). A review: probiotic in man and animals. *Journal Applied Environmental Microbiology*. 63:1034-1039.
- GABOR, E-F.; ŞARA, A.; BARBU, A. (2010). The effects of some phytoadditives on growth, health and meat quality on different species of fish. *Animal Science and Biotechnologies*, 43(1):61-65.
- GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S15–S28 (Supplement).
- GASTALHO, S.; SILVA, G.J. DA; RAMOS, F. (2014). Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 3(1)29-45.
- GENG, X.; DONG, X. H.; TAN, B.P.; YANG, Q. H.; CHI, S. Y.; LIU, H. Y.; LIU, X. Q. (2011). Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunology*, 31, 400-6.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J. Nutr.* 125:1401-1412.
- HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RINGO, E.; YOON, I. (2009). Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in cages. *Aquaculture*. 294: 99-107.
- HEREK, Ö.; KARA, I.G.; KALELI, I. (2004). Effects of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation injury. *Surgery Today*, 34: 256-260.
- HEUER, O.; KRUSE, H.; GRAVE, K.; COLLIGNON, P.; KARUNASAGAR, I.; ÂNGULO, F.J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious*

Diseases. 49(8):1248-1253.

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D.J.; LOGATO, P.V.R.; PICCOLI, R.H.; FIGUEIREDO, H.C.P. (2006). Identificação e resitência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambiente aquáticos. Ciênc. agrotec., Lavras, 30 (6): 1211-1217.

HUSSAIN, M.G. (2004). Farming of tilapia: Breeding Plans, Mass Seed Production and Aquaculture Techniques. Bangladesh Fisheries Research Institute, Mymensingh 2201, Bangladesh.149.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, ISSN 0101-4234, v. 41, p.1-108, 2013. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_daPecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 25, 333–342.

KASHKOOL, O.B.; DORCHEH, E. E.; SAMIE, A. (2011). Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 315–318.

KASKHEDIKAR, M.; CHHABRA, D. (2009). Multiple drug resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates from Chicken samples collected from Mhow and Indore city of Madhyapradesh. Veterinary World, 2 (1): 31-32.

KIRON, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. Animal Feed Science and Technology, 173:111– 133.

KOMAR, C. 2008. Disease Management in Tilapia. Global Aquaculture Advocate.

KONSOWA, A.H. (2007). Ecological studies on fish farms of El-Fayon depression (Egypt). Egyptian Journal of Aquatic Research. 33(1):290-300.

KOZIŃSKA, A.; PEKALA, A. (2010). Serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria. Bull Veterinary Institute Pulawy, Poland. 54:315-320.

KUBITZA, F. (2000). Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: Fernando Kubitza, p. 289.

LARA-FLORES M.; OLVERA-NOVOA, M. A; GUZMÁN-MÉNDEZ, B. E.; López-Madrid, W. (2003). Use of the bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216: 193-201.

LUTZHOFT, H.; HALLING-SORENSEN, B.; JORGENSEN, S. (1999). Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 36(1):1-6.

MEHRABI, Z.; FIROUZBAKHS, F.; JAFARPOUR, A. (2012). Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. J Anim Physiol Anim Nutr, 96: 474-481.

MEIRELLES, F.S. (2010). Estudo epidemiológico das infecções bacterianas em tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivadas em Pernambuco. 2010. 77f. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.

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. Aquacult. Nutr. 16, 496–503.

MEURER, F.; COSTA, M.M.; BARROS, D.A.D.; OLIVEIRA, S. T. L.; PAIXÃO, P.S. (2009). Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. Aquaculture Research. 40: 603–608.

MEURER, F.; OLIVEIRA, S.T.L.; SANTOS, L.D.; OLIVEIRA, J.S.; COLPINI, L.M. (2010). Níveis de oferta de pós-larva de tilápia do Nilo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 5(1):111-116.

MPA. 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. (2012). Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>. Acesso em: 14/03/2016.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. (2002). Aspectos tecnológicos de alimentos funciona. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 38(1):1-21.

- OLIVEIRA, S.T.L. (2011). Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo suplementadas com *Ascophyllum nodosum*. 2011. 88f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.
- OLIVEIRA, S.T.L.; VENERONI-GOUVEIA, G.; SANTOS, A.C.; SOUSA, S.M.N.; VEIGA, M.L.; KREWER, C.C.; COSTA, M.M. (2014). *Ascophyllum nodosum* in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect after inoculation of *Aeromonas hydrophila*. Pesquisa Veterinária Brasileira, 4(5): 403-408.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (2008). Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília, 276.
- PABLOS, M.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J. M.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L. (2009). Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. International Journal of Food Microbiology. p. 158-164.
- PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. (2014). Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. Química nova, São Paulo, 37(1): 111-122.
- PARK H.M.; KIM J.; CHANG K.S.; KIM B.; YANG Y.J.; KIM G.H.; SHIN S.C.; PARK I.L. (2011). Larvicidal activity of myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. J Med Entomol, 48: 405-410.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. (2008). Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, 311.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. (2010). Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Africa Journal Microbiology Research. 4: 420-425.
- REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E.; BELO, M.A.A.; MORAES, F.R. (2010). Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. Aquaculture. 300: 37-42.
- ROBERFROID, M.B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs? Am. J. Clin. Nutr. Bethesda, n. 73, p. 406-409.
- ROBERFROID, M.B. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. Dig. Liver Dis., Rome, 34(2): S105-S110.
- RODRIGUEZ-ESTRADA, U.; SATOH, S.; HAGA, Y.; FUSHIMI, H.; SWEETMAN, J. (2009). Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Scientia, 57: 609-17.
- ROMERO J.; FEIJOÓ C.; NAVARRETE P. (2012). Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives; In: Carvalho E, editor. Health and Environment in Aquaculture. 414p.
- SADO, R.Y.; MATUSHIMA, E.R. (2007). Avaliação histopatológica, imunohistoquímica e ultraestrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus* spp.) ao BCG. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 44:58-64.
- SANTOS, F. G. B. (2011). Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com potencial patogênico em pacamã (*Lophiosilurus alexandri Steindachner, 1877*). Petrolina, PE; UNIVASF. 2011, p. 67. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco.
- SCHMIDT A.S.; BRUUN M.S.; DALSGAARD I.; PEDERSEN K.; LARSEN J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. Appl Environ Microbiol 66: 4908-4915.
- SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. (2001). Incidence, distribution and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile *Aeromonads* from a fish farming environment. Applied and Environmental Microbiology, 67(12): 5675–5682.
- SCHROEDER, B.; WINCKLER, V.M.B.; FAILING, K. et al. (2004). Studies on the time course of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on electrolyte transport in pig jejunum. Digestive Disease and Science, 49: 1311-1317.
- SEBRAE. (2015). Aquicultura no Brasil: Séries estudos mercadológicos. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 76. DISPONÍVEL EM: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)

- SFORCIN, J.M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 1–14.
- SHMIDT, A. S.; BRUNN, M. S.; DALSGAARD, I.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4908-4815.
- SILVA, L. J.(2011). *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais pesados Pertolina, PE; UNIVASF. 2011, p. 60. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco.
- SMITH, P.R. (2008). Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In L. B. J. and H. K. Luca Guardabassi, editores. *Guide to antimicrobial use in animals*. Blackwell. 207-8.
- SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. 2006. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera offi cinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium offi cinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Revista Brasileira Farmacogn*, 16: 447-454.
- SORUM, H. (2000). Farming if Atlantic salmon – an experience from Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, 93: 129-134.
- SORUM, H. (2006). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Aarestrup, F. M. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press, Chapter 13, 213-238.
- STARLIPER, C.E.; KETOLA, H.G.; NOYES, A.D.; SCHILL, W.B.; HENSON, F.G.; CHALUPNICKI, M.A.; DITTMAN, D.E. (2014). An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*.
- SUTILI, F.J.; CUNHA, M.A.; ZIECH, R.E.; KREWER, C.C.; ZEPPENFELD, C.C.; HELDWEIN, C.G.; GRESSLER, L.T.; HEINZMANN B.M.; VARGAS, A.C.; BALDISSEROTTO, B. (2015). *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. *An Acad Bras Cienc*. 87(1):95-100.
- TALAS, Z.S.; GULHAN, M.F. (2009). Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotox Environ Safe*. 72: 1994–1998.
- TAVARES, J.P., MARTINS, I.L., VIEIRA, A.S., LIMA, F.A.V., BEZERRA, F.A.F., MORAES, M.O., MORAES, M.E.A. (2006). Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. *Revista Brasileira Farmacogn*, 16: 350- 356.
- TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L.B. (2009). Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *Inst. Pesca, São Paulo*. 35(2): 335-341.
- TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob agents chemoth*, 2474–2478.
- 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.
- VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. (2002). Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 165–168.
- WANG, C.; SILVA, J.L. (1999). Prevalence and characterization of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. *Journal of Food Protection*, 62(1): 30–34.
- WANG, Y. F.; WANG, Y. H.; CUI, S.J.; WANG, C.L. (2000). Bivalent propolis-adjuvanted inactivated vaccine against rabbit colibacillosis. *Chin J Prev Vet Med*. 22: 332–335.
- YE, J. D.; WANG, K.; LI, F.D.; SUN, Y.Z. (2011). Single or combined effects of fructo- and mannanoligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 17: 902-11.

- YU, H.B. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Applied and Environmental Microbiology* v. 71, n. 8, p. 4469–4477.
- ZHANG, Q.; MA, H.; MAI, K.; ZHANG, W.; LIUFU, Z.; XU, W. (2010). Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 204-211.
- ZHENG Z. L., TAN J. Y., LIU H. Y., ZHOU X. H., XIANG X., WANG K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*. 292:214-218.

Artigo Submetido para Ciência Animal Brasileira**EXTRATO DE PRÓPOLIS NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) E SEU EFEITO APÓS INFECÇÃO POR
*AEROMONAS HYDROPHILA*****PROPOLIS EXTRACT IN FEEDING TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) AND
ITS EFFECT AFTER INFECTION *AEROMONAS HYDROPHILA*****Samira Teixeira Leal de Oliveira¹****Gisele V. Gouveia²****Mateus M. Costa²**

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da UFRPE, e-mail: samirazootec@yahoo.com.br

²Docentes de Zootecnia da UNIVASF, CCA, Petrolina, PE, Brasil, 56304-917, e-mail: gisele.veneroni@univasf.edu.br; mateus.costa@univasf.edu.br

RESUMO

O extrato alcoólico de própolis (EEP) é uma alternativa aos antimicrobianos, que vem sendo largamente estudado na alimentação animal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da alimentação com o extrato de própolis em tilápias do Nilo sob desafio sanitário decorrente da inoculação com *Aeromonas hydrophila*. O experimento teve duração de 35 dias, em que 120 alevinos de tilápias do Nilo com 30 dias e $1,08 \pm 0,01$ g de peso médio foram distribuídos em 20 aquários. Cada unidade experimental foi constituída por um aquário de 60L com seis alevinos. Ração com inclusão do extrato de própolis ($24,4 \text{ mL kg ração}^{-1}$) e uma ração testemunha (sem o extrato) foram utilizadas na primeira etapa experimental. Após 30 dias de experimento, foi realizada a inoculação de *A. hydrophila*, na concentração de 10^8 UFC/mL^{-1} , formando então os tratamentos da segunda etapa que consistiu dos grupos alimentados com ração testemunha desafiados ou não com *A. hydrophila*, assim como para o EEP, formando quatro tratamentos e cinco repetições. Nessas condições, foi possível verificar que o extrato de própolis não influenciou nos parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápias. Após a inoculação, foi verificada uma grande mortalidade, mas não significativa entre os tratamentos inoculados com *A. hydrophila*, entretanto a recuperação das lesões nos animais inoculados com *A. hydrophila* e alimentados com extrato de própolis foi mais rápida que no grupo controle. Foi possível concluir que o extrato de própolis, não influencia nos parâmetros de sobrevivência, desempenho e rendimento de carcaça de alevinos de tilápias do Nilo. Contudo o mesmo contribuiu para recuperação das lesões provocadas por *A. hydrophila* nos animais inoculados.

Palavras chave: Aditivo alimentar, piscicultura, microbiologia, desafio bacteriano

ABSTRACT

The alcoholic extract of propolis (EEP) is an alternative to antibiotics, which has been widely studied in animal feed. The objective of this study was to evaluate the effect of food with the propolis extract of Nile tilapia under health challenge resulting from inoculation with *Aeromonas hydrophila*. The experiment lasted 35 days, in which 120 fingerlings of Nile tilapia 30 days and 1.08 ± 0.01 g average weight were distributed in 20 aquariums. Each experimental unit was constituted by a 60L tank six fingerlings. Feed with inclusion of propolis extract (24.4 mL kg^{-1} feed) and a control diet (without extract) were used in the first experimental stage. After 30 days of the experiment, inoculation of *A. hydrophila* was performed at a concentration of $10^8 \text{ CFU / mL}^{-1}$, thus forming the second treatment step consisting of the groups fed with control diet or not challenged with *A. hydrophila*, and for EEP, forming four treatments and five replications. Under these conditions, we found that propolis extracted did not influence the performance parameters of tilapia. After inoculation, a great mortality was observed, but no significant between inoculated treatment with *A. hydrophila*, however the recovery of lesions in animals inoculated with *A. hydrophila* and fed propolis extract was more rapid than in the control group. It was concluded that propolis extract, does not influence survival parameters, performance and carcass yield of fingerlings of Nile tilapia. Yet the same contributed to the recovery of injuries caused by *A. hydrophila* in inoculated animals.

Keywords: Additive alimentario, pisciculture, microbiology, bacterial challenge

INTRODUÇÃO

A piscicultura nacional é um ramo da zootecnia que está em evidência. Fato este relacionado à grande aptidão do país para este tipo de atividade, como o clima adequado e grande disponibilidade de água, além do que o peixe é reconhecidamente um alimento de ótima qualidade nutricional. Dentro das espécies mais comumente cultivadas estão as de origem exótica, como o caso da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Frente aos animais domésticos explorados comercialmente, como suínos, aves e bovinos, a disponibilidade de informações sobre os aspectos de manejo e nutrição para a piscicultura, mesmo em espécies mais difundidas, é menor ⁽¹⁾. Fato que dificulta o cultivo racional de espécies podendo levar a uma inviabilidade econômica da atividade.

Essa atividade está embasada em três pilares: a produção lucrativa, a preservação do meio ambiente e o desenvolvimento social ⁽²⁾. A tilápia do Nilo é uma espécie de peixe de clima tropical, que se adaptou muito bem ao Brasil. Constituindo-se o segundo grupo de peixes de maior importância na aquicultura mundial ⁽³⁾. Características como a adaptação tanto à alimentação natural quanto a artificial ou seu consórcio, desde o período larval, o alto desempenho, a resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e o seu filé de ótima qualidade organoléptica, contribuíram para o sucesso desta espécie ⁽⁴⁾.

Os problemas advindos de enfermidades levam a significativas perdas em piscicultura, afetando o desenvolvimento econômico do setor⁽⁵⁾. Com o crescimento da piscicultura intensiva no Brasil, observa-se o aumento da ocorrência de patologias nos sistemas de produção, em que as *A. hydrophila*, apresentam maior virulência ⁽⁶⁾ e estão envolvidos em consideráveis perdas na piscicultura ⁽⁷⁾.

Drogas antimicrobianas utilizadas para o controle de doenças tem tido um sucesso limitado na prevenção em piscicultura. O uso indiscriminado, tanto para o controle de doenças como promotores de crescimento, aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos levando à resistência bacteriana. Além da proliferação das bactérias resistentes após a morte das não resistentes ao antibiótico, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras que nunca foram expostas a tal antibiótico^(8,9). Além do mais, a antimicrobianoterapia pode matar ou inibir a microflora normal, que é benéfica aos peixes. Em qualquer situação o sucesso da terapia antimicrobiana está em função da escolha do agente apropriado, mas existem poucos fármacos antimicrobianos de escolha para aquicultura⁽¹⁰⁾.

A própolis é um produto constituído por uma mistura de diversas resinas vegetais, o qual é coletado por abelhas em plantas comumente visitadas por estes insetos. As investigações sobre as propriedades antibióticas da própolis têm sido conduzidas, sobretudo, na área médica e veterinária, onde o produto tem demonstrado uma eficiente atividade bacteriostática e bactericida em relação a diversos gêneros de bactérias Gram positivas e Gram negativas⁽¹¹⁾.

Desta forma, a execução de trabalhos com desafios sanitários e uso de aditivos naturais, pode contribuir para o desenvolvimento de estudos e novas tecnologias para o controle de doenças sem exposição do meio ambiente e mercado consumidor. Por essas condições, o presente trabalho objetiva avaliar o efeito da inclusão do extrato de própolis como aditivo natural à ração, sob desafio com *A. hydrophila*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, vinculado ao Curso de Zootecnia, no *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) de Petrolina, PE.

A pesquisa foi conduzida conforme protocolo nº 0006/160812, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco – CEUA, UNIVASF, de janeiro de 2013. Foram selecionados 120 alevinos de tilápia do Nilo sexualmente revertidos, com 30 dias de idade, com peso médio de $1,08 \pm 0,01\text{g}$, distribuídos

em 20 aquários com 60L de volume útil. Os alevinos foram provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiro e Aquicultura (CIRPA) de Petrolina-PE. Cada unidade experimental constou de um aquário contendo seis peixes.

Avaliou-se o fornecimento do extrato de própolis por um período de 30 dias, em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos e dez repetições. Os tratamentos testados foram o fornecimento de 24,4 g kg ração⁻¹, e uma ração testemunha. Transcorrido esse período, foi feita a inoculação de *A. hydrophila* e solução salina (como controle) nos alevinos. Os tratamentos consistiram de quatro grupos: sendo em dois fornecida ração testemunha, um inoculado com solução salina (Tratamento 1) e outro inoculado com *A. hydrophila*. (Tratamento 3) e, dois grupos que foram alimentados com ração contendo extrato de própolis, sendo um deles inoculado com solução salina (Tratamento 2) e outro inoculado com de *A. hydrophila* (Tratamento 4), formando quatro tratamentos e cinco repetições, em um delineamento inteiramente casualizado.

Foi utilizado no experimento um extrato de própolis comercial, composto de própolis diluída em álcool neutro grau alimentício e água purificada, proveniente do estado de São Paulo. O extrato foi submetido à caracterização fitoquímica, a fim de garantir os teores dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais na amostra, constando de 126,22 mg (12,62%), equivalente de ácido gálico por grama de extrato de própolis, e de 51,06 mg (5,10%) equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis⁽¹²⁾. O extrato foi adicionado à ração teste na quantidade de 7,32 g kg⁻¹.

A qualidade da água dos aquários foi controlada por aeração constante, por meio de pedras microporosas, ligadas a minicompressores de ar e sua troca diária. A sifonagem era realizada pela manhã (7h00) e tarde (16h30min), com a remoção de cerca de 40% da água, na qual ocorria a retiradas as fezes e eventuais restos de ração. A limpeza interna das paredes dos tanques foi feita semanalmente para evitar o aparecimento de perifíton.

Foram formuladas duas rações contendo 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível (Tabela 1), composição e percentual das dietas foram adaptadas de Costa et al⁽⁷⁾. Para a fabricação das rações os alimentos foram moídos em peneira de 1 mm, posteriormente foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica, e estes peletes secos em estufa de ventilação forçada por 24h a 55°C. Quando secos, foram quebrados e assim, adequado o tamanho do pélete à boca dos alevinos.

O arraçoamento foi feito três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 17h00, em um nível de 10% do peso vivo dos alevinos. Semanalmente, as unidades experimentais eram pesadas para a adequação da quantidade de ração fornecida.

Tabela 1. Composição das rações experimentais

Ingredientes ¹	g Kg ração ⁻¹	
	Tratamentos 1 e 3	Tratamentos 2 e 4
Farelo de soja	71,39	70,79
Milho	13,00	16,70
Óleo de soja	6,10	5,00
Fosfato bicálcico	2,80	2,80
Calcário calcítico	0,20	0,20
Extrato de própolis mL Kg ração ⁻¹	0,00	24,4
Suplemento mineral e vitamínico ²	4,00	4,00
Sal	0,50	0,50
Butil hidroxi tolueno (BHT)	0,01	0,01
Total	100,00	100,00

¹ De acordo com Rostagno et al. (2000); ² Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ác. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg.

A inoculação das *A. hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo foi realizada após 30 dias experimentais com fornecimento do extrato de própolis na ração. Por um preparado de inóculo bacteriano com diluição em solução salina estéril a concentração de 10^8 UFC mL⁻¹, padronizado em espectrofotometria, injetada via intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe experimental, assim como a solução salina pura foi aplicada na proporção de 0,5 mL animal⁻¹.

Tal isolado pertencia a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF. Esse isolado foi obtido a partir do peixe pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*), proveniente do CIRPA de Bebedouro/PE. Foi previamente identificado por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al.⁽¹³⁾ e, por meio de PCR para confirmação de gênero e espécie, segundo metodologia descrita por Ghatak et al.⁽¹⁴⁾. Seus fatores de virulência também foram caracterizado, confirmando presença dos genes elastase e lipase segundo Sen⁽¹⁵⁾.

Diariamente, antes das sifonagens, foram aferidas a concentração de oxigênio, temperatura, condutividade elétrica e pH da água dos aquários experimentais (medidor multiparâmetros modelo HI 9828, HANNA Instruments).

Para controle da higidade da água de cultivo, a água dos aquários foi semeada em meio Ágar Sangue, antes do procedimento de inoculação de *A. hydrophila* nos peixes experimentais. Os

peixes de cada unidade experimental, com 30 dias experimentais foram pesados e medidos para determinação dos parâmetros de desempenho.

A partir da inoculação, os animais foram avaliados quanto a eventuais manifestações de infecção por *A. hydrophila* e mortalidade. Dos peixes mortos pelo tratamento, foi feito cultivo bacteriano do rim em meio Ágar Triptona de Soja (TSA), assim como no final do experimento.

Depois de avaliados todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, sobrevivência, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA). O pressuposto de homogeneidade foi verificado pelo teste Levene. Quando verificando efeito significativo ($p < 0,05$) realizou-se o teste Tukey caso pelo software *Statistica 5.0*.

RESULTADOS

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram $27,62 \pm 0,08^\circ \text{C}$ e $28,38 \pm 0,08^\circ \text{C}$; $7,47 \pm 0,11$ e $8,04 \pm 0,03$; $6,58 \pm 0,06$ e $6,26 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$; $52,0 \pm 0,02$ e $78,8 \pm 0,58 \mu\text{Sm cm}^{-1}$, respectivamente. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos ($P > 0,05$).

A partir da água dos aquários não houve crescimento de *A. hydrophila*. Do cultivo bacteriano do rim e lesões ulcerativas, em meio TSA, a partir dos peixes mortos em função do desafio, houve crescimento de colônias bacterianas de gênero *Aeromonas*, apenas nos tratamentos com inoculação. No entanto, um comportamento diferente foi verificado no cultivo a partir do rim dos alevinos na finalização do experimento, em que no tratamento com o fornecimento de extrato de própolis e desafiados com *A. hydrophila* (Tratamento 4) o crescimento foi inferior ao tratamento controle com fornecimento de ração sem própolis desafiados com *A. hydrophila* (Tratamento 3), ($1,6 \text{ UFC mL}^{-1}$ e 117 UFC mL^{-1} respectivamente) não havendo crescimento nos demais tratamentos (Tratamentos 1 e 2).

Os valores médios de crescimento e características de carcaça, após 30 dias experimentais, dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos à ração contendo $24,4 \text{ mL Kg ração}^{-1}$ de extrato de própolis, estão apresentados na Tabela 2. O peso inicial dos alevinos utilizados no experimento foi semelhante ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

As médias de peso final, comprimento total, comprimento padrão, altura, ganho de peso, conversão alimentar aparente e fator de condição corporal não apresentaram diferenças

significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos em função do fornecimento de $24,4 \text{ mL kg ração}^{-1}$ de extrato de própolis na ração. A sobrevivência foi de 100 % em todas as unidades durante este período experimental.

Tabela 2. Valores médios de crescimento dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com ração testemunha (1) e $24,4 \text{ mL kg ração}^{-1}$ de extrato de própolis (2)

Variáveis	Grupos		P*
	1	2	
Peso médio inicial (g)	$1,08 \pm 0,012$	$1,08 \pm 0,01$	0,50
Peso médio final (g)	$5,83 \pm 0,97$	$6,01 \pm 0,75$	0,32
Comprimento total (cm)	$7,11 \pm 0,24$	$7,24 \pm 0,14$	0,08
Comprimento padrão (cm)	$5,82 \pm 0,62$	$5,92 \pm 0,12$	0,13
Largura (cm)	$1,06 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,04$	0,02
Altura (cm)	$1,98 \pm 0,11$	$2,05 \pm 0,10$	0,06
Ganho de peso (g)	$4,86 \pm 2,49$	$4,82 \pm 2,31$	0,11
Conversão alimentar aparente	$1,36 \pm 0,15$	$1,37 \pm 0,07$	0,86
Fator de condição	$0,029 \pm 0,001$	$0,029 \pm 0,0006$	0,11

*P = P-valor

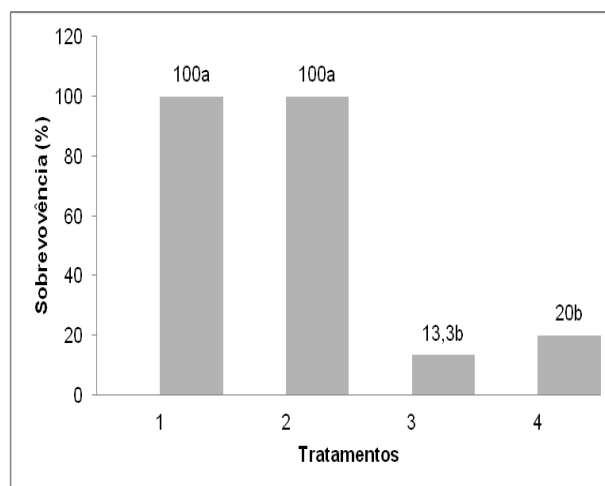


Figura 1. Sobrevivência dos alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com inoculação de *A. hydrophila*. - (1) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina; (2) ração contendo $24,4 \text{ mL kg}^{-1}$ de extrato de própolis, inoculados com solução salina; (3) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com *A. hydrophila*; (4) ração contendo $24,4 \text{ mL kg}^{-1}$ de extrato de própolis, inoculados com *A. hydrophila*.

A sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo após desafio com *A. hydrophila* encontram-se na Figura 1. Ocorreu diferença significativa entre os tratamentos inoculados com solução salina (controles) e os tratamentos desafiados com *A. hydrophila* ($P < 0,05$). Em contrapartida não houve diferença entre os tratamentos desafiados com *A. hydrophila* recebendo ou não o aditivo alimentar.

Nos peixes do tratamento controle (inoculados com 0,5% de solução salina estéril), não houve mortalidade, sinais clínicos ou qualquer anormalidade comportamental. Nos grupos desafiados com *A. hydrophila*, foi possível verificar perda de equilíbrio e movimentos respiratórios lentos e ascite, sinais clínicos também encontrados corresponderam à erosão de nadadeiras e perdas de escamas, lesões ulcerativas, principalmente nas proximidades do local de inoculação e músculo caudal, além de exoftalmia. Analisando a ocorrência de lesões nos animais inoculados com *A. hydrophila* alimentados ou não com extrato de própolis, foi possível observar uma maior regressão no tamanho das lesões no grupo alimentado com extrato de própolis Figura 2.

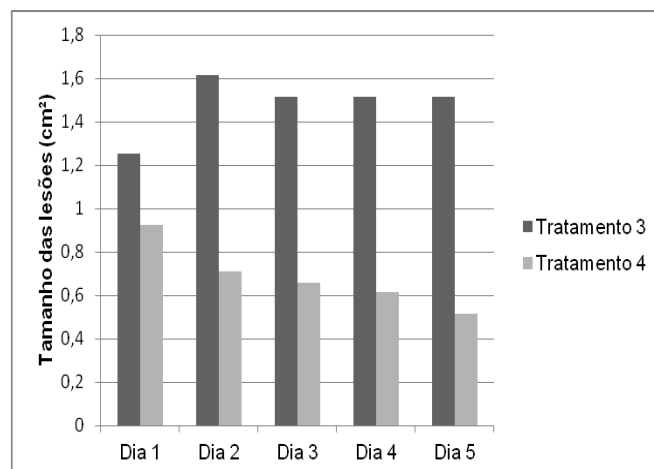


Figura 2. Acompanhamento das lesões ocasionadas pela infecção por *A. hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo alimentados (T4) ou não (T3) com extrato de própolis.

DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários, pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperaturas matutina e vespertina permaneceram dentro dos limites adequados para a espécie⁽¹⁶⁾.

O inóculo na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ utilizado no experimento com extrato de própolis, apresentou elevada virulência. Após a inoculação os peixes exibiram apatia e redução dos movimentos voluntários. Em menos de 12 horas cerca de 80% dos animais experimentais submetidos ao desafio morreram. O cultivo do rim em meio TSA permitiu a confirmação da relação da morte dos peixes em função da presença das bactérias inoculadas. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Bojink e Brandão⁽¹⁷⁾, que usando concentrações bacterianas de *A. hydrophila* semelhantes ($1,3 \times 10^9$ e $3,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de solução salina), observaram 100% de mortalidade em 24 horas após a inoculação em alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Contudo, dos animais sobreviventes, os sinais de infecção causados pela bactéria foram mais atenuados em função da alimentação com o EEP. Novas análises devem ser conduzidas afins de verificar o efeito da própolis após o desafio sanitário. Para isso, seria necessário o uso de uma menor concentração do inóculo, como observado no experimento em que foi testado o aditivo alimentar farinha da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, no qual, os alevinos foram desafiados com concentração do inóculo bacteriano de 10^6 UFC mL⁻¹ de solução salina⁽¹⁸⁾.

Embora a capacidade da bactéria em ocasionar enfermidade esteja relacionada ao estresse do hospedeiro, pesquisadores tem relatado *A. hydrophila* como patógeno emergente primário, possuindo mecanismos altamente específicos para promoção de doença^(19,20,21,22). Nieto et al.⁽²³⁾ sugerem que estas manifestações são resultado dos produtos extracelulares que apresentam efeito narcótico atuando no sistema nervoso central. *Aeromonas* spp. são importantes agentes infecciosos em peixes⁽²⁴⁾, sua patogenicidade vem sendo foco de estudos e tem sido relacionada a diversos fatores de virulência^(25,26,27,28,15,29,30). Os isolados, utilizados neste experimento, apresentaram elevada virulência, que pode ser comprovada pela alta mortalidade observada.

Os parâmetros zootécnicos após o desafio não foram analisados, em função da elevada mortalidade ocasionada pela *A. hydrophila*. Isto se deve a concentração utilizada no desafio. Antecedendo a inoculação, tais parâmetros foram avaliados e não foi observada diferença significativa após a utilização do extrato de própolis. Esse fato não está de acordo com os achados por Azza e Abd-El-Rhman⁽³¹⁾, que obtiveram melhores respostas quanto às características de crescimento nos alevinos de tilápia desafiados com *A. hydrophila* e alimentados com extrato de própolis na ração. Do mesmo modo, Deng et al.⁽³²⁾, forneceram 2

a 4 g kg⁻¹ de extrato etanólico de própolis na dieta para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), descreveram uma melhora no desempenho e eficiência alimentar. Meurer et al.⁽³³⁾ quando no fornecimento de 2,22 g kg⁻¹ de extrato de própolis para a tilápia do Nilo, também obtiveram respostas superiores ao tratamento testemunha. Contudo, tais pesquisadores trabalharam com animais maiores e encontraram respostas positivas em doses inferiores de extrato.

As respostas aos estudos com própolis são bastante diversificadas; Cuesta et al.⁽³⁴⁾ não encontraram resultados satisfatórios, sobre a resposta imune inata, trabalhando com gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) alimentados com extrato de própolis na ração. Os resultados atuais concordam com os encontrados por Franco et al.⁽³⁵⁾ e Açıkgöz et al.⁽³⁶⁾ que não relataram diferença entre as dietas de frangos de corte suplementados com extrato de própolis em comparação a dieta controle e, Meurer et al.⁽³³⁾, em sua maior dose (4 g kg⁻¹) não verificaram diferença em relação ao tratamento testemunha. Isto nos leva a supor que a dose utilizada no presente experimento pode ser elevada para a espécie em questão. Perez et al.⁽³⁷⁾ e Garcia et al.⁽³⁸⁾ estudando a influência da dose parenteral da própolis sobre a resposta imune em coelhos, verificaram que doses mais altas sugerem uma influência inibitória e doses mais baixas mostraram melhores resultados, refletindo-se em níveis mais elevados de imunoglobulinas e anticorpos, e alterações no metabolismo. Sforcin⁽³⁹⁾ verificou que a atividade das células *natural killer* foi elevada nos grupos tratados com própolis, revelando sua ação imunomoduladora.

Apesar de sua ação antimicrobiana reconhecida, diante dos achados neste estudo, é possível relatar que a alimentação suplementada com extrato de própolis não surtiu efeito satisfatório na resistência das tilápias frente à infecção ocasionada por *A. hydrophila*, verificado com a elevada mortalidade. Contudo, em uma parcela da população (grupo alimentado com o extrato), houve uma redução no tamanho das lesões. Esse é um fato que deve ser considerado uma vez que, as escamas, a pele e o muco dos peixes auxiliam na redução de perdas de sais para o ambiente externo, além do muco possuir substâncias neutralizantes, que somados, agem como barreira contra organismos patogênicos⁽⁴⁰⁾. Injúrias físicas são porta de entrada para novas infecções, o que leva o peixe a um grau elevado de estresse. A própolis provavelmente atuou no processo de reepiteliação das lesões causadas por *A. hydrophila*.

Segundo relatos da literatura, a própolis é ativa principalmente contra bactérias Gram positivas e tem atividade limitada contra bactérias Gram negativas^(41,42,43). A fagocitose tem sido reconhecida como uma importante atividade celular do sistema imune inato dos peixes⁽⁴⁴⁾. Peixes tratados com imunoestimulantes mostram aumento na fagocitose, bem como na atividade de explosão respiratória⁽⁴⁵⁾. Trabalhos tem demonstrado que a própolis melhora

essas atividades⁽³²⁾. Efeitos sinérgicos também têm sido observados quando a própolis é trabalhada em conjunto com outro reforço imunológico, como vacinas⁽⁴⁶⁾ e ervas⁽⁴⁷⁾.

Pesquisas têm demonstrado que algumas substâncias presentes na própolis podem combinar-se com proteínas do organismo e tornarem-se imunogênicas, resultando em um quadro de hipersensibilidade⁽⁴⁸⁾ e intoxicação em organismos sensíveis. Respostas de hipersensibilidade induzidas, podem estar especialmente relacionadas aos derivados dos ácidos cinâmicos, mencionado por Ramos e Miranda⁽⁴⁹⁾. Outro fator limitante ao uso do extrato de própolis é a sua grande variabilidade nas amostras, suas atividades farmacológicas e composição química. Em testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram encontradas atividades bacterianas nas concentrações de 80 µg mL⁻¹ descrita por Azza e Abd-El-Rhman⁽³¹⁾ com própolis do Egito frente a um isolado de *Aeromonas* spp.. Andrade et al.⁽⁵⁰⁾ encontraram uma CBM média de 16.935,50 µg mL⁻¹ para própolis verde da região nordeste brasileira frente a *A. hydrophila*. Amarante⁽¹²⁾ avaliando a mesma própolis comercial utilizada no presente estudo, encontrou CBM de 68,7 µg mL⁻¹ para um maior número de isolados de *Staphylococcus* spp., e confirmou sua padronização nos padrões químicos estabelecidos.

A própolis tem demonstrado efeitos satisfatórios principalmente em resposta a experimentos “*in vitro*”. Para respostas “*in vivo*”, não existe um consenso, bem como carência de trabalhos desta natureza em peixes, que quando encontrados, em sua maioria tratam de aspectos das respostas do sistema imune relacionada à sua inclusão^(51,34). A utilização de própolis como aditivo necessita de validação com outros estudos, com a utilização de diferentes doses e até outras espécies de peixes.

CONCLUSÃO

O extrato de própolis como aditivo alimentar, na dose testada, não influenciou os parâmetros de desempenho e carcaça de alevinos de tilápia do Nilo. Embora sem efeito sobre a mortalidade de alevinos de tilápia do Nilo inoculadas com *A. hydrophila*, o extrato de própolis foi eficaz na redução do cultivo bacteriano do rim dos peixes sobreviventes, além de contribuir para reepiteliação das lesões.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e a CODEVASF-PE pela importante parceria.

REFERENCIAS

1. Fracalossi DM, Cyrino JEP. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 368, 2012.
2. Castellani D, Barrella W. Caracterização da Piscicultura na Região do Vale do Ribeira – SP. Ciência Agrotecnologia, Lavras, v. 29, n 1, p. 168-176, jan./fev. 2005.
3. Bombardelli RA, Hayashi C, Natali MRM. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-Nilo. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.941-949, 2010.
4. El-Sayed AM. Tilapia culture. CABI Publishing, Oxford, 277 pp., 2006.
5. Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology, v.65, n.3, p.969-9732, 1999.
6. Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, p. 311, 2008.
7. Costa AB. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, SP: USP, 2003. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, 2003.
8. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64. n.4, p. 655-671, 2000.
9. FAO (Food and Agriculture Organization). Expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul: Republic of South Korea, 2006.
10. Guardabassi L, Jensen IB. Guia de Antimicrobianos em Veterinária. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 267, 2010.
11. Bianchini L, Bedendo IP. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola*, v.55, n.1, 1998.
12. Amarante FA. composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de mastite bovina. Petrolina, PE: UNIVASF, 2011. p. 54 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2011.
13. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Medicine. London, Mosby-Year ed. p. 648, 1994.

14. Ghatak S, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, p.550-554, 2007.
15. Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can. J. Microbiol*, v. 51, p. 957-966, 2005.
16. Kubitzka, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundáí, SP – Brasil, ed. 1, p. 229, 2003.
17. Boijink CL, Brandão DA. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciencia Rural*, v.31, p.503-507, 2001.
18. Oliveira, STL, Veneroni-Gouveia G, Santos AC, Sousa SMN, Krewer C, Costa M.M *Ascophyllum nodosum* in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect after inoculation of *Aeromonas hydrophila*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 4(5), p. 403-408, 2014.
19. Chacon MR, Soler L., Groisman EA, Guarro J., Figueras MJ. Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates. *Journal of clinical microbiology*, v.42, n. 3, p. 1285–1287, 2004.
20. Vilches S, Urgell C, Merino SM, Chacon R, Soler L, Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Tomas JM. Complete Type III Secretion System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* Strain. *Applied and environmental microbiology*, v. 70, n. 11, p. 6914–6919, 2004
21. Sha J, Pillai L, Fadl AA, Galindo CL, Erova TE, Chopra AK. The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and immunity*. v. 73, n. 10, 2005, p. 6446–6457.
22. Yu HB. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Applied and Environmental Microbiology* v.71, n.8, p.4469–4477, 2005.
23. Nieto TP, Santos Y, Rodriguez LA, Ellis AE. An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microbial Pathogenesis*. v. 11, p. 101-110, 1991.
24. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, p. 35–73, 2010.
25. Chakraborty T, Montenegro MA, Sanyal SC, Helmuth R, Bulling E, Timmis KN. Cloning of Enterotoxin Gene from *Aeromonas hydrophila* Provides Conclusive Evidence of Production of a Cytotoxic Enterotoxin. *Infection and immunity*, v. 46, n. 2, p. 435-441, 1984.
26. Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 152, p. 1–10, 1997.
27. Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 99, p. 4638–4643, 2002.
28. Yu HB, Srinivasa Rao PS, Lee HC, Vilches S, Merino S, Tomas JM, Leung KY. A Type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and Immunity*. v. 72, p. 1248–1256, 2004.
29. Nam IY, Joh K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, v.45, n.4, p. 297-304, 2007

30. Oliveira SR, Souza RTYB, Brasil EM, Andrade JI A, Nunes ÉSS, Ono EA, Affonso EG. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. Acta Amazônica, vol. 41(2), p. 321-326, 2011.
31. Azza MM, Abd-El-Rhman. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology, v.27, n.3, p.454-459, 2009.
32. Deng J, An Q, Bi B, Wang Q, Kong L, Tao L, Zhang X. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry. v. 37, p. 959-967, 2011.
33. Meurer F, Costa MM, Barros DAD, Oliveira STL, Paixão PS. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. Aquaculture Research. 40, 603-608, 2009.
34. Cuesta A, Rodríguez A, Esteban MA, Meseguer J. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. Fish and Shellfish Immunology. v. 18, p. 71-80, 2005.
35. Franco SS, Rosa AP, Lengler S, Uttpatel R, Zanella I, Gressler C, Souza HM. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. Ciência Rural, v.37, n.6, p.1765-1771, 2007.
36. Açıkgöz Z, Yücel B, Altan Ö. The effects of propolis supplementation on broiler performance and feed digestibility. Archiv fur Geflügelk, v. 69, p. 117-122, 2005.
37. Perez I, Sola A, Hernandez R, Diaz Y, Rizhenko VP. Influencia de las dosis parenteral de propoleo sobre la respuesta imune (RES), en conejos. In: ASIS, M. Investigaciones cubanas sobre el propoleo: Memorias del 1º Simposio sobre los efectos del propoleo en la salud humana y animal, 1988. Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, p. 230-3, 1989.
38. Garcia RC, Sá MEP, Langoni H, Funari SRC. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. Acta Scientiarum .Animal Sciences, v.26, n.1, p.57-67, 2004b.
39. Sforcin JM. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladora e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico dos ratos. 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.
40. Silveira USS, Logato PVR, Pontes EC. Fatores estressantes em peixes. Revista eletrônica nutritime, v.6, n. 4, p. 1001 – 1017, 2009.
41. Garcia RC, Sá MEP, Langoni H, Funari SRC. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida in vitro* e em coelhos. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v.26, n.1, p.69-77, 2004a.
42. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. Ciência Rural, v.34, p.159-163, 2004.
43. Loguercio AP, Groff ACM, Pedrozzo AF, Witt NM, Silva MS, Vargas AC. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, n.2, p.347-349, 2006.

44. Macarthur JI, Fletcher TC. Phagocytosis in fish. In: Manning MJ, Tatner MF, editors. Fish immunology. London: Academic Press. p. 29–46, 1985.
45. Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. v. 172, p. 63–92, 1999.
46. Zheng Z, Yingeng W, Qingyin W, Nannan D, Meijie L, Jiangbo Q, Bin L, Lan W. Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish & Shellfish Immunology*. v. 32, p. 391 e 395, 2012.
47. Zhang G, Gong S, Yu D, Yuan H. Propolis and Herba Epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. v. 26, p. 467–472, 2009.
48. Paulino, N. Reação de hipersensibilidade à própolis. *Revista da Universidade de Franca, Franca*, v. 7, p. 16, 1999.
49. Ramos AFN, Miranda JL. Própolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases*. v. 13, p. 697-710, 2007.
50. Andrade NPC, Silva SEM, Mota RA, Veschi JLA, Ribeiro MF, Krewer CC, Costa MM. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. *Arq. Inst. Biol.* v.79, n.1, p.9-15, 2012.
51. Chu, W. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish & Shellfish Immunology*. v. 21, p. 113-117, 2006.

Artigo Submetido para Pesquisa Veterinária Brasileira

Óleos essenciais: sensibilidade frente à *Aeromonas hydrophila* e sua inclusão na alimentação de tilápia¹

Samira Teixeira Leal de Oliveira², Renilde Cordeiro de Souza³, Gisele Veneroni-Gouveia², Mateus Matiuzzi da Costa^{2*}

ABSTRACT.- Oliveira, S.T.L¹, Souza, R.C., Costa, M.M., Veneroni-Gouveia, G. 2017. **[Essential oils: sensitivity profile *Aeromonas hydrophila* front and their inclusion in the feed tilapia and its effect after desafio]** Óleos essenciais: perfil de sensibilidade frente à *Aeromonas hydrophila* e sua inclusão na alimentação de tilápia e seu efeito após desafio. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* Ciências Agrárias, Rodovia Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Nilo Coelho s/n, C1, Petrolina, PE, 56300-000, Brasil. E-mail: mateus.costa@univasf.edu.br

The essential oils include natural substances by being, in turn, secure the point of view of environmental health and pubis. Its use as an alternative to antibiotics and food additives has become a tool of major interest for the therapy and animal husbandry. This study evaluated the “*in vitro*” antimicrobial activity of oregano essential oils, rosemary and black pepper, isolated against *Aeromonas hydrophila* (n = 100). To determine the antimicrobial activity, we used the broth microdilution technique with determination of minimum bactericidal concentration. The oregano essential oil (OEO) showed the best activity, inhibiting 66.0% of the isolates tested. The results indicate that it is promising to use the OEO in combating *A. hydrophila*. Thus, also evaluated in the effect of increasing doses of the OEO as functional food added to the feed to the Nile tilapia, challenged with *A. hydrophila*. The fingerlings (3.29 ± 0.01g) were distributed in aquariums, and subjected to increasing levels of OEO 0.5, 1.0 and 1.5% kg feed⁻¹, being prepared also a control diet. After 30 days of feeding, the challenge was performed with *A. hydrophila*, in a concentration of 10⁶ CFU / ml. clinical signs of infection were observed (erosion fins loss of scales, ulcerative lesions, exophthalmos and ascites) beyond mortality. The bacterial inoculum had no activity against virulent challenge with the fish, so that survival was increased. The values of the parameters studied were submitted to analysis of variance and regression. The average final weight, weight gain, presented a quadratic behavior due to the increased levels of OEO (p <0.05), with respective maximum points at 0.58% kg⁻¹. In the mean test showed no significant difference (p > 0.05) with the control group. The feed conversion and feed efficiency showed significant differences (p <0.05) for the lowest dose. The other parameters tested were not affected by treatments. The OEO the inclusion level associated with the best performance parameters were between 0.5% and 1 kg chow⁻¹. Thus, the oregano essential oil stands out with potential use for fish nutrition.

INDEX TERMS: oregano essential oil, rosemary essential oil, black pepper essential oil, *Aeromonas hydrophila*, *Oreochromis niloticus*.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Campus Ciências Agrárias, Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Rodovia BR 407 Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho s/n, C1, Petrolina, PE, 56300-000, Brasil. *Autor para correspondência: mateus.costa@univasf.edu.br

³ Laboratório de Estudos e Fisiologia de Fauna Aquática (LEFFA) Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Geremoabo, 147 - Campus de Ondina, Instituto de Biologia, 2o andar, sala 03.21, 40170-290, Salvador, BA.

RESUMO. - Os óleos essenciais destacam-se por serem substâncias naturais, por sua vez, seguras do ponto de vista da saúde pública e ambiental. Seu uso como alternativa aos antimicrobianos e aditivos alimentares tornou-se uma ferramenta de grande interesse para a terapêutica e produção animal. O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos óleos essenciais de orégano, alecrim e da pimenta negra, frente a isolados de *Aeromonas hydrophila* (n=100). Para determinação da atividade antimicrobiana, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, com determinação da concentração bactericida mínima. O óleo essencial de orégano (OEO) apresentou a melhor atividade, inibindo 66,0% dos isolados testados. Os resultados obtidos indicam ser promissora a utilização do OEO no combate a *A. hydrophila*. Desta forma, avaliou-se também o efeito de doses crescentes do OEO como alimento funcional adicionado à ração, para a tilápia do Nilo, desafiadas com *A. hydrophila*. Os alevinos (3,29±0,01g) foram distribuídos em aquários, e submetidos à níveis crescentes do OEO 0,5, 1,0 e 1,5% kg ração⁻¹, sendo preparada também uma ração testemunha. Após 30 dias de alimentação, foi realizado o desafio com *A. hydrophila*, na concentração de 10⁶ UFC/mL. Foram observados sinais clínicos da infecção (erosão de nadadeiras, perdas de escamas, lesões ulcerativas, exoftalmia e ascite) além da mortalidade. O inoculo bacteriano não apresentou atividade virulenta diante do desafio com os peixes, de forma que a sobrevivência foi elevada. Os valores dos parâmetros estudados foram submetidos à análise de variância e de regressão. As médias de peso final, ganho de peso, apresentaram um comportamento quadrático em função do aumento dos níveis de OEO (p<0,05), com respectivos pontos de máxima em 0,58% kg⁻¹. No teste de médias não houve diferença significativa (p>0,05) com o grupo controle. A conversão alimentar e a eficiência alimentar, apresentaram diferença significativa (p<0,05) para a menor dose. Os outros parâmetros testados não foram afetados pelos tratamentos. O nível de inclusão do OEO associados aos melhores parâmetros de desempenho estiveram entre 0,5 e 1% Kg ração⁻¹. Desta forma, o óleo essencial de orégano destaca-se com potencial uso para a nutrição de peixes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Óleos essenciais, orégano, alecrim, pimenta negra, *Aeromonas hydrophila*, *Oreochromis niloticus*

INTRODUÇÃO

Na produção intensiva de peixes, é comum a utilização de antibióticos e quimioterápicos para prevenção ou tratamento das bacterioses. Entretanto, o uso indiscriminado dessas substâncias tem gerado uma preocupação crescente com a emergência de bactérias resistentes a tais compostos, o que pode afetar diretamente a saúde dos animais e humanos (Agnew & Barnes, 2007, Citarasu, 2010).

A atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais vem apresentando resultados satisfatórios, dentre estes, a pimenta negra (*Piper nigrum*), o orégano (*Origanum vulgare*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (Stoyanova et al. 2006, Busatta et al. 2007, Derwich et al. 2011), fato este que encorajam seu uso como possível alternativa para substituir ou diminuir o uso de antimicrobianos em peixes, e protegê-los de possíveis infecções bacterianas como as provocadas por *Aeromonas hydrophila*.

Como aditivo alimentar, estudos demonstraram que o óleo essencial de orégano apresentou efeitos positivos sobre o ganho de peso e conversão alimentar em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ahmadifar et al. 2011), aumenta a atividade antioxidante, reduz a mortalidade provocadas por *A. hydrophila* em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Zheng et al. 2009) sendo, portanto, considerado um potencial promotor de crescimento, imunoestimulante e antimicrobiano para peixes.

A tilápia, é mundialmente, a espécie de maior sucesso nos cultivos, mesmo assim, está sujeita a bacterioses oportunistas (Acar et al. 2015), o que pode provocar prejuízos aos produtores. Nesse sentido, objetivou-se no presente estudo, investigar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos óleos essenciais de orégano (*O. vulgare*), alecrim (*R. officinalis*) e da pimenta negra (*P. nigrum*) e se a adição de níveis de óleo essencial de orégano, melhora o desempenho, a resposta imune e a resistência contra *A. hydrophila* em tilápia do Nilo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do *Campus* Ciências Agrárias, localizado na Fazenda experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Petrolina, PE.

A pesquisa foi conduzida conforme protocolo nº 0006/160812, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco – CEUA, UNIVASF, de janeiro de 2013.

Isolados bacterianos. Os isolados de *A. hydrophila*, foram obtidos a partir de rim, tegumento, intestino e lesões de pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*), estes animais foram provenientes da Barragem de Sobradinho/BA e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura (CIRPA) de Bebedouro Petrolina, PE. Tais isolados foram previamente identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994) e através de PCR para confirmação de gênero e espécie, segundo metodologia descrita por Ghatak et al. (2007). Fatores de virulência também foram caracterizados, sendo positivos para os genes Lipase (Sem, 2005), Elastase (Cascón et al. 2000) e o gene Fla (Santos et al. 2010).

Teste de sensibilidade aos óleos essenciais. A sensibilidade de *A. hydrophila* (n=100 isolados) frente aos óleos essenciais foi realizada por concentração bactericida mínima (CBM). Do qual, o inóculo bacteriano foi cultivado em Muller Hinton Ágar, confeccionando uma suspensão com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala de McFarland (1×10^6) = 9,9 mL caldo Muller Hinton (MH) + 0,1mL da suspensão, em seguida, foi inoculando 10 μ L em cada poço (o inóculo se dilui a 1:20), a concentração final do poço foi de 5×10^4 células/poço.

Foram testados três óleos essenciais: óleo essencial de orégano (*O. vulgare*), alecrim (*R. officinalis*) e pimenta do reino (*P. nigrum*). Os óleos essenciais utilizados eram comerciais (QUINARÍ), extraídos pelo método de destilação por arraste a vapor da erva florida da planta ou da semente, como o óleo de pimenta do reino.

Para cada óleo, a diluição foi realizada pela pesagem de 1g do produto, sendo este diluído em metanol até atingir a concentração de 640mg mL^{-1} em seguida, diluiu-se 1:100 em caldo MH a fim de eliminar ao máximo o metanol (maior concentração) e fazer sucessivas diluições 1:2 em caldo MH.

A atividade antimicrobiana dos isolados foi feita através da técnica de diluição padrão em caldo (microdiluição) e da técnica de diluição em ágar para bactérias aeróbicas (CLSI, 2014). Foram adicionados 200 μ L do óleo diluído em caldo Muller Hinton (MH) em diferentes concentrações nos poços. As concentrações finais foram de 3.200, 1.600, 800, 400, 200, 100, 50 e 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Em seguida, colocou-se 10 μ L de inóculo sobre cada poço. Incubadas as microplacas a 28°C por 24 horas e foi feita a leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM) visualmente considerando CIM50 (50% de inibição do crescimento bacteriano) e CIM100 (100% de inibição do crescimento bacteriano) baseando-se no crescimento do controle positivo. A CIM foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível fez-se o repique deste poço para placas de Petri contendo ágar MH, incubou-se por 48 horas e realizou-se a leitura. A CBM foi determinada onde não ocorreu crescimento no ágar MH. Como o inóculo é $\leq 10\%$ do volume, a diluição não é considerada.

O óleo que apresentou o maior potencial de atividade inibitória contra os isolados de *A. hydrophila*, foi então escolhido para o teste “*in vivo*”, como aditivo alimentar para alevinos de tilápia do Nilo.

Óleo essencial de orégano na alimentação de tilápia (*O. niloticus*) e seu efeito após a inoculação de *A. hydrophila* - Condições experimentais. Afins de avaliar o óleo essencial que obteve o melhor resultado no teste “*in vitro*”, escolheu-se o óleo essencial de orégano para inclusão em rações para alevinos de tilápia. Foram utilizados 120 animais de mesma idade, com peso médio de $3,29 \pm 0,01 \text{g}$. Provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiro e Aquicultura (CIRPA) de Petrolina, PE. Os animais foram estocados em 20 quários de vidro de 60 L de volume útil. Cada aquário contendo seis peixes constituiu uma unidade experimental.

Diariamente eram realizadas sifonagens uma vez pela manhã (7h00) e outra à tarde (16h00), com a remoção de cerca de 40% da água. Além da troca de água, eram também retirados materiais fecais e eventuais restos de ração. Limpeza interna das paredes dos aquários eram realizadas semanalmente para o controle de crescimento de perifítons. Os aquários possuíam aeração constante, por meio de pedras micro-porosas ligadas a mini-compressores de ar.

Os tratamentos utilizados no presente trabalho foram quatro rações, uma testemunha (sem adição do óleo) e outras três com níveis crescentes do óleo essencial de orégano (0,5, 1,0 e 1,5% kg ração^{-1}), e desafiados com *A. hydrophila*. Ainda foi mantido um grupo, alimentados com ração testemunha e inoculados com solução salina como controle do desafio. O experimento teve a duração de 45 dias.

Rações. Foram formuladas rações contendo 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível kg de ração^{-1} (Quadro 1). Para a fabricação das rações os alimentos foram moídos em peneira de 1mm, posteriormente foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica, e os peletes secos

em estufa de ventilação forçada por 24 horas a 35° C. Quando secos, foram quebrados e assim, adequado ao tamanho do pelete à boca dos alevinos, então armazenadas em freezer a -20°C.

O arraçoamento foi feito três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 17h00, em um nível de 10% do peso vivo dos peixes. Semanalmente, os peixes eram pesados para a adequação da quantidade de ração fornecida.

Óleo essencial de orégano. Foi utilizado o OEO, de coloração marrom-avermelhada, extraído pelo método de destilação por arraste a vapor da erva florida da planta. Apresenta como componente majoritário o carvacrol (65% no mínimo), de acordo com os achados por Viana, 2013 em análise em CG-EM do mesmo óleo, entre os constituintes, o carvacrol apresentou-se como majoritário do óleo essencial com 67,97% do total de constituintes presentes, seguido por p-cimeno (11,67%), γ -terpineno (7,92%), timol (7,84%) e linalol (3,44 %). Os valores do óleo utilizado nas rações testes foram de 0,5, 1,0 e 1,5 mL kg ração⁻¹. No preparo da ração, o óleo foi previamente misturado ao óleo de soja e então misturado aos demais ingredientes.

Teste de desafio. Após quatro semanas de alimentação, os peixes foram desafiados por meio de um preparado de inóculo bacteriano (*A. hydrophila*) com diluição em solução salina estéril a concentração de 10⁶ UFC/mL, padronizada em espectrofotometria. Essa solução foi injetada via intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe experimental, assim como a solução salina pura foi aplicada na proporção de 0,2mL animal⁻¹, no tratamento testemunha. Após a inoculação, os animais foram mantidos em observação por 15 dias. Os peixes mortos foram utilizado para re-isolamento bacteriano, a partir do cultivo do rim em meio TSA.

Mensurações e análises experimentais. Os parâmetros físico químicos da água, foram aferidos diariamente, quanto a concentração de oxigênio, temperatura, condutividade elétrica e pH da água dos aquários experimentais (medidor multiparâmetros modelo HI 9828, HANNA Instruments).

No dia antecedente ao desafio, foi feito um cultivo da água dos aquários em meio TSA, a fim de verificar a qualidade microbiológica quanto à presença de *A. hydrophila* no ambiente.

Ao final do período experimental, depois de anestesiados com benzocaína (100mg/L) e eutanasiados por secção medular, os peixes de cada unidade experimental foram pesados e medidos para a determinação dos parâmetros de desempenho e carcaça. Dois peixes de cada unidade experimental tiveram o seu fígado extraído para a determinação do índice hepatossomático (IHS) [(peso do fígado/ peso corporal) x100] e, de um deles, foi feito cultivo bacteriano do rim em meio ágar Triptona de Soja (TSA).

Atividade da lisozima. A análise do parâmetro imune não específico da atividade da lisozima dos animais sobreviventes foi realizada de acordo com metodologia descrita por Ellis (1990) e Obach et al. (1993), com pequenas modificações. O sangue foi centrifugado (2.000G/15 min) e o soro obtido foi mantido a -20°C. O nível de lisozima foi medida por ensaio turbidimétrico, utilizando lisozima liofilizada (2mg/mL) de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich/L4631) como padrão. Para determinação da curva de calibração foram adicionadas diferentes concentrações de solução de lisozima diluída 1.000X até a obtenção das concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 η g e o volume completado para 150 μ l com tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2), sendo também adicionado 150 μ l da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2mg/mL), em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), totalizando um volume final de 300 μ l. Como controle foi utilizado o tampão fosfato (300 μ l). A redução da densidade óptica (OD) em 620nm foi avaliada entre o tempo zero e 6 minutos a 26°C e a curva de calibração para lisozima foi obtida considerando os valores da redução da OD para cada concentração versus a concentração de lisozima em um volume final de 300 μ l.

Posteriormente, as amostras de soro foram aquecidas (banho-maria a 56°C por 30 minutos) para inativar as proteínas do sistema complemento e para certificar que a lise do *M. lysodeikticus* foi ocasionada exclusivamente por ação da lisozima. Em microplacas de ELISA, foram adicionados 10 μ L de soro, 140 μ L de tampão fosfato de sódio e 150 μ l de suspensão *M. lysodeikticus* (0,2mg/mL) para completar 300 μ L de volume final. Logo após, a absorbância foi medida em leitora de placa de Elisa Easys® e mensurada em filtro de 620 nm no tempo zero, e então foram incubadas durante seis minutos em estufa à 26°C. Uma amostra em branco foi preparada utilizando tampão de fosfato de sódio (300 μ L). Diferença entre a turbidez inicial e final (densidade óptica (OD) de redução) foi medida entre o tempo zero e seis minutos, a 620 nm. Os resultados foram expressos usando os valores de redução de OD para cada volume da amostra

(300µl). A equação de regressão linear da curva de calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima no soro (µg/mL) dos peixes.

Análise estatística. Depois de avaliados todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, sobrevivência, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos análise de variância (One-way ANOVA). O pressuposto de homogeneidade foi verificado pelo teste Levene. Caso verificado diferença significativa ($p < 0,05$), realizou-se o teste Tukey para variâncias homogêneas e foram propostos modelos de regressão para avaliar o desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo níveis crescentes de óleo essencial de orégano. Utilizou-se o *software* Statistica 5.0 para todas as análises.

RESULTADOS

Teste de sensibilidade aos óleos essenciais. As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de plantas diluídas em metanol estão descritas no Quadro 2. Todos os óleos essenciais testados apresentaram atividade inibitória frente *A. hydrophila*. Por sua vez, o óleo essencial de orégano se destacou com a melhor atividade (66%).

Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) na alimentação de tilápia (*O. niloticus*) e seu efeito após a inoculação de *A. hydrophila* - Água dos aquários e cultivo bacteriano.

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram $26,54 \pm 0,01^\circ\text{C}$ e $27,46 \pm 0,11^\circ\text{C}$, $7,27 \pm 0,03$ e $8,14 \pm 0,08$, $6,44 \pm 0,16$ e $6,76 \pm 0,04$ mg/L, $78,25 \pm 0,02$ e $84,24 \pm 0,02$ μScm^{-1} , respectivamente. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos.

No cultivo da água dos aquários, confirmou-se a higidez da água, uma vez que não houve crescimento de *Aeromonas* spp.. Houve crescimento de colônias bacterianas de gênero *Aeromonas*, a partir do cultivo feito em meio TSA do rim e de lesões ulcerativas dos peixes mortos em função do desafio. Após quinze dias da inoculação, o cultivo do rim foi realizado e não foi observado crescimento de colônias.

Foi observado após o desafio com *A. hydrophila* erosão de nadadeiras, perdas de escamas, lesões ulcerativas, principalmente nas proximidades do local de inoculação e músculo caudal, além de exoftalmia. Os sinais clínicos que também precederam a morte de animais infectados foram perda de equilíbrio, movimentos respiratórios lentos e ascite. Nos peixes dos tratamentos controle inoculados com solução salina, não houve mortalidade ou qualquer anormalidade de comportamento.

Características e rendimento de carcaça.

Os valores médios de peso inicial, comprimento total, comprimento padrão, altura, largura, fator de condição corporal, rendimento de carcaça com e sem cabeça, dos alevinos de tilápia do Nilo, submetidos à rações contendo níveis crescentes de óleo essencial de orégano desafiados com *A. hydrophila* encontram-se no Quadro 3. O peso inicial dos alevinos utilizados no experimento foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em função do aumento dos níveis de OEO ($p > 0,05$) nas rações.

Crescimento, conversão alimentar, eficiência alimentar e consumo.

Os valores médios dos parâmetros de crescimento, conversão alimentar, eficiência alimentar e consumo total de ração dos alevinos de tilápia do Nilo submetidas à rações contendo níveis crescentes de OEO, desafiados com *A. hydrophila* estão apresentados no Quadro 4 e, suas respectivas equações na Figura 1. Para esses parâmetros houve diferença significativa ($p < 0,05$).

As médias de peso final e ganho de peso apresentaram um comportamento quadrático em função do aumento dos níveis de OEO ($p < 0,05$) nas rações, apresentando pontos de máxima em $0,58\% \text{ kg ração}^{-1}$ no teste de médias foi possível verificar que, embora os tratamentos 3 e 4 possuam médias superiores, diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) apenas do tratamento 5.

A conversão alimentar aparente (CAA) e a eficiência alimentar (EA) não apresentaram modelo significativo ($p > 0,05$) na regressão. Todavia, a partir da equação foi possível identificar o ponto de mínima para a CAA e máxima para a EA, ambas $0,63\% \text{ kg ração}^{-1}$. No teste de médias, o tratamento 3 demonstrou ser estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao controle na EA, assim como houve uma melhor significativa na CAA, não diferindo dos demais tratamentos.

Sobrevivência, índice hepatossomático e lisozima

A sobrevivência foi de 100% em todas as unidades experimentais durante o período antecedente ao desafio sanitário. Os valores médios de índice hepatossomático, lisozima sérica do sangue e percentagem de sobrevivência após o desafio com *A. hydrophila* (Quadro 5), não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$) em função do OEO e da inoculação de *A. hydrophila*. Os alevinos inoculados com solução salina, para o controle (T1), apresentaram 100% de sobrevivência até o final do período experimental.

A curva de calibração de lisozima apresentou alta correlação linear ($r^2=0,978$) entre 50 e 300 ng de lisozima por microlitro.

DISCUSSÃO

Em função da elevada resistência bacteriana aos antimicrobianos, existe uma necessidade de descoberta de novas substâncias a partir de fontes naturais, incluindo plantas com fitoconstituintes potenciais. Sartoratto et al. (2004) propuseram uma classificação para a atividade antimicrobiana de óleos essenciais com base nos resultados de CBM (Concentração Bactericida Mínima) considerando como elevada atividade os que apresentam valores entre 50-500 $\mu\text{g/mL}$; moderada atividade entre 600-1500 $\mu\text{g/mL}$ e fraca atividade acima de 1.500 $\mu\text{g/mL}$. Na atual pesquisa os óleos essenciais testados apresentaram atividade inibitória frente *A. hydrophila*, todavia, de acordo com a classificação citada a cima, o óleo essencial de alecrim teria baixa atividade e os óleos essenciais de pimenta do reino e de orégano, atividade moderada. Entretanto, esta classificação constitui um método subjetivo, não levando em consideração uma série de fatores que podem interferir nos resultados da CBM. O fato é que, ainda não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais, quando comparados com antibióticos padronizados (Duarte, 2007).

De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial de orégano foi o que apresentou melhor atividade contra os isolados de *A. hydrophila*, inibindo 66,0% dos isolados testados. Um dos mecanismos da ação bactericida dos óleos essenciais de orégano se dão pela alteração da permeabilidade da membrana celular e mitocondriais, desestruturando tais membranas, o que pode resultar em morte celular (Lambert et al. 2001). Suas propriedades são atribuídas principalmente à presença dos fenóis carvacrol e timol e os monoterpenos γ -terpineno e p-cimeno (Bampidis, 2005, Zheng et al. 2009, Brenes & Roura, 2010), tais constituintes estão presentes no óleo experimental. Em contrapartida, os óleos essenciais de pimenta negra e alecrim apresentaram um baixo espectro de ação quanto ao micro-organismo testado, corroborando com Indu et al. (2006), ao testarem o extrato de pimenta para 20 sorotipos de *Escherichia coli*, 8 sorotipos de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *A. hydrophila*; e Trajano et al. (2009) contra bactérias contaminantes de alimentos. Apesar do óleo de alecrim apresentar alguns resultados satisfatórios (Fadili et al. 2014, Hussain et al. 2010), outros autores observaram efeito inferior em comparação a demais óleos (Sienkuwicz et al. 2013, Santoyo et al. 2005).

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários, pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperaturas matutina e vespertina permaneceram dentro dos limites adequados para a espécie (Kubitza, 2003).

Em função da considerada atividade “*in vitro*” do OEO, o mesmo foi testado “*in vivo*”. Foram observados resultados positivos em relação ao peso final, ganho de peso, conversão alimentar e eficiência alimentar, com melhores resultados associados aos níveis de inclusão do OEO de 0,5% (5g/kg ração⁻¹) e 1,0% (10g/ kg ração⁻¹). Efeitos satisfatórios da inclusão do óleo de orégano também foram observados em lambaris-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) (Ferreira et al. 2014) e *Ictalurus punctatus* (Bedford, UK) alimentados com produto comercial contendo óleo natural de *Origanum heracleoticum L.* (Zheng et al. 2009). A utilização de timol e carvacrol, substâncias encontradas no óleo de orégano, também melhoraram o desempenho e o crescimento da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ahmadifar et al. 2011, Giannenas et al. 2012). Essa melhora no desempenho pode estar associada às propriedades antioxidantes de proteção do orégano, o qual estimula a digestão orgânica e microbiana, inibindo micro-organismos patogênicos intestinais (Giannenas et al. 2012, Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010), o microbioma intestinal saudável, conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrintestinal (Saad, 2006). O orégano e seus compostos isolados também podem ser capazes de estimular o crescimento das vilosidades intestinais (Fukayama, 2005, Giannenas et al. 2012), o que favorece um melhor aproveitamento do alimento, garantindo assim melhores índices, como os encontrados no presente experimento. Tal fato contribui para evitar a descarga de resíduos orgânicos concentrados, principalmente em criações intensivas, que empobrecem a qualidade da água e, somados as condições de estresse gerados pelo sistema de criação, propicia ao aumento da incidência de doenças, causando uma diminuição na produtividade (Cruz et al. 2012).

Na maior dose do OEO testada na presente pesquisa (15 g/kg ração⁻¹), foi evidenciada uma queda no consumo da ração, levando a piores índices de crescimento. Bampidis et al. (2005) sugerem que o orégano pode afetar a palatabilidade da ração, provocando rejeição pelos animais, o que corrobora com o fato de 1,5% do aditivo ter levado a um menor consumo de ração pelos alevinos. O óleo de orégano e seus compostos vêm sendo estudados em dietas como aditivos alimentares em diversas espécies animais, como para frangos (Botsoglou et al. 2002; Demir et al. 2003, Lewis et al. 2003, Lee et al. 2003, Fukayama et al. 2005), codornas (Cetingul et al. 2007), suínos (Henn et al. 2010), tilápia do Nilo (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010) e robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (Volpatti et al. 2012). Nesses trabalhos não foram observados efeito sobre o desempenho produtivo em função do uso do aditivo nas dietas, o que demonstra a importância de estudos avaliando dose e fases de crescimento distintas a fins de determinar melhor dose resposta.

No presente estudo também não foi observado efeito sobre a atividade de lisozima sérica nas tilápias, o difere dos resultados obtidos por Zheng et al. (2009), e Ahmadifar et al. (2011), quanto aos parâmetros imunológicos. Melhorias na sobrevivência também foram relatados em tilápias do Nilo frente a desafio com *Edwardsiella tarda* (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010) e lambaris-do-rabo-amarelo infectados com *A. hydrophila* (Zheng et al. 2009). O modo de ação dos fenóis contra as bactérias assemelha-se ao dos antibióticos sintéticos (alterações na permeabilidade da membrana celular bacteriana), fato este que pode elucidar o efeito sobre a sobrevivência dos alevinos (Walsh et al., 2003). A mortalidade no presente trabalho foi baixa, todavia esse efeito foi atribuído ao inoculo bacteriano, que não demonstrou elevada atividade virulenta diante do desafio sanitário proposto.

O uso de ingredientes em rações de peixes que proporcionem uma maior resistência às enfermidades, sem com isso deixar resíduos na carne, minimizando o impacto ambiental dos promotores de crescimento, melhorando o desempenho, resultam numa melhor sustentabilidade do sistema. Na linha de pesquisa dos óleos essenciais, os componentes fenólicos são mais ativos (Burt, 2004). Neste sentido, trazem perspectivas positivas ao seu uso, embora mais pesquisas devem ser realizadas para melhor elucidá-lo, tanto em fases, quanto em espécies de peixes diferentes, como perfil sensorial do produto final.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de pimenta preta, alecrim e orégano apresentaram baixa, moderada e elevada atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* quando avaliados “*in vivo*”, respectivamente. Desta forma, sugerem-se estudos adicionais com outros micro-organismos, ou a avaliação do efeito sinérgico entre os óleos essenciais.

O nível dos melhores parâmetros de desempenho foi de 0,58% kg ração⁻¹.

A adição de 0,5% do óleo essencial de orégano pode ser utilizada na dieta para a tilápia do Nilo sem prejuízos ao desempenho produtivo, e pode ser considerado um potencial promotor de crescimento natural para peixes.

Agradecimentos. - À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e a CODEVASF-PE pela doação dos alevinos.

REFERÊNCIAS

- Acar U., Kesbiç O.S., Yilmaz S., Gültepe N., Türker A. 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 437:282-286.
- Agnew W., Barnes A.C. 2007. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol* 122, 1-15.
- Ahadifar E., Falahatkar B., Akrami R. 2011. Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Ichthyol.* 27: 1057-1060.
- Bampidis V. A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E., Chatzopoulou P. S., Tsiligianni, T., Spais A. B. 2005. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *Br. Poult. Sci.* 46:595-601.
- Botsoglou N. A., Christaki E., Fletouris D. J., Florou-Paneri P., Spais A.B. 2002. The effect of dietary regano essential oil on lipid oxidation in raw cooked chicken during refrigerated storage. *Meat science.* 62:259-265.

- Brenes, A., Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science Technology*, 158: 1–14.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253
- Busatta C., Mossi A.J., Rodrigues, M.R.A., Cansian, R.L., Oliveira, J.V. 2007. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38 (4): 610-616.
- Cascon A., Yugueros J., Temprano A., Sánchez M., Hernanz C., Luengo, J. M., Naharro G. A. 2000. Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*. 68 (6) 3233-3241.
- Cetingul I. S., Bayram I., Akkaya A. B., Uyarlar C., Yardimci M., Sahin E. H., Segör E. 2007. Utilization of oregano (*Origanum onites*) in laying quails (*Coturnix coturnix japonica*) (2): The effects of oregano on performance, carcass yield, liver and some blood parameters. *Archiva Zootechnica*.10:57-65.
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult. Int.* 18:403-414.
- CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 34 (1). ISBN 1-56238-898-3 (Electronic).
- Cruz, P., Ibáñez, A. L., Hermosillo, O. A. M., Saad, H. C. R. 2012 Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network (ISRN Microbiology)*, Article ID 916845, p. 13.
- Demir E., Sarica, S., Ozcan M.A., Suiçmez, M. 2003. The use of natural feed additives as alternatives for an antibiotic growth promoter in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 44 (1), S44–S45.
- Derwich E., Benziane. Z.; Chabir R., Taouil. R. 2011. *In vitro* antibacterial activity and gc/ms analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in morocco. *Intern. Jour. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3)
- Duarte M. C. T. 2007. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*. 7:1-16.
- Ellis A.E. 1990. Lysozyme assay. In: Stolen JS, Fletcher DP, Anderson BS, Robertson BS, editors. *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publication; p. 101-103.
- Fadili K., Ayane S., Hadic O., Elhilali F., Khabbal Y., Zair T. 2014. Phytochemistry and Antibacterial Activity of Essential Oils of Two Species of *Rosmarinus* the High Atlas Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 8 (16): 287-295.
- Ferreira P. M. F., Nascimento L. S., Dias D. C., Moreira D. M. V., Salaro A. L., Freitas M. B. D. 2014. Essential oregano oil as a growth promoter for the Yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquacult. Soc.* 45(1).
- Fukayama E. H., Bertechini A. G., Geraldo A., Kato R. K., Murgas L. D. S. 2005. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Rev. Bras. de Zootec.* 34(6): 2316-2326.
- Ghatak S., Agarwal R.K., Bhilegaonkar, K.N. 2007. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. *Letters in Applied Microbiol.* 44: 550-554.
- Giannenas I., Triantafyllou E., Stavarakakis S., Margaroni M., Mavridis, S., Steiner T., Karagouni E. 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 350: 26-32.
- Henn J. D., Bertol T. M., Moura N. F., Coldebella A., Brum P. A. R., Casagrande M. 2010. Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. *Rev. Bras. de Zootec.* 39(8):1761-1767.
- Hussain A. I., Anwar F., Chatha A. S., Jabbar1 A., Mahboob S., Nigam P. S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz. Journal of Microbiol.* 41: 1070-1078.
- Indu M.N., Hatha A.A.M., Abirosh C., Harsha U., Vivekanandan G. 2006. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. Journal of Microbiol.* 37:153-158.
- Kubitza, F. 2003. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundá, SP – Brasil, 1: 229.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G.J. R. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Appl. Microbiol.* 91:453-462.
- Lee K.W., Everts H., Kappert H.J., Frehner M., Losa R., Beynen A.C. 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 44:450-457.

- Lewis M.R., Rose S.P., Mackenzie A.M., Tucker L.A. 2003. Effects of dietary inclusion of plant extracts on the growth performance of male broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 44(1) S43–S44.
- Obach A., Quentel C., Bandin L.F. 1993. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis Aquat Org.* 15:175-185.
- Quinn, P.J., Cartey, M. E., Markey, B., Carter, G. R. 1994. *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Vibrio* species In.: Microbiology Veterinary Clinical, Virginia-USA, Sec. 2, Cap. 20: 243-247.
- Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. 2010. Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* *in vitro* and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:420-425.
- Rostagno H.S., Albino L.F.T., Gomes P.C., Oliveira R.F., Lopes D.C. 2000. Tabelas Brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais. Editora UFV, Viçosa, 2000. p.141.
- Saad, Su. M. I. 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 42(1).
- Santos P.G., Santos P. A., Bello A. R., Freitas-Almeida, A. C. 2010. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. *Appl. Microbiol.* 52: 49-55.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L, Ibañez E., Señoráns F.J., Reglero G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* l. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4):790-795.
- Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira G. M., Duarte M. C. T., Rehder V. L. G. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. Journal Microbiol.* 35:275-280.
- Sen K. 2005. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can. J. Microbiol.* 51: 957-966.
- Sienkiewicz M., Łysakowska M., Pastuszka M., Bienias W., KOWALCZYK E. 2013. The potential of use Basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules.* 18:9334-9351.
- Stoyanova A., Denkova Z., Nenov N., Slavchev A., Jirovets L., Buchbauer G., Lien H.N., Schmidt E., Geissler M. 2006. Oleoresins of black pepper (*Piper nigrum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) from Vietnam: antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfatoric evaluation. *Electronic Journ. of Environmental, Agric. and Food Chem.* 5(6) 1615-1623.
- Trajano V. N., Lima E. O., Souza E. L., Travassos A. E. R. 2009. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciênc. e Tecnol. de Alim.* 29(3): 542-545.
- Viana, P. V. 2013. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium*. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências e Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 95.
- Volpatti D., Chiara B., Francesca T., Marco G. 2012. Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Reseach.* 1-14.
- Walsh, S. E., MAILLARD, J. Y., RUSSELL, A. D. et al. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Jornal applied microbiology.* (94): 240-247.
- Zheng Z. L., Tan J. Y., LIU H. Y., Zhou X. H., Xiang X., Wang K. Y. 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish *Ictalurus punctatus*). *Aquaculture.* 292:214-218.

Legenda das Figuras

Fig.1. Parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo níveis crescentes de óleo essencial de orégano: a) peso final; b) ganho de peso; c) consumo de ração; d) conversão alimentar aparente eficiência alimentar; e) eficiência alimentar: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 1,0% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 1,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

TABELAS E FIGURAS

Quadro 1. Composição das rações experimentais.

Ingredientes	%
Farelo de soja	70,79
Milho	16,70
Óleo de soja	5,00
Fosfato bicálcico	2,80
Calcário calcítico	0,20
Suplemento mineral e vitamínico ²	4,00
Sal	0,50
Butil hidroxi tolueno (BHT)	0,01
Total	100,00

¹ De acordo com Rostagno et al. (2000); ² Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ác. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg.

Quadro 2. Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais diluídos em metanol frente *A. hydrophila* obtidas de peixes do Vale do São Francisco.

Espécie	Atividade observada (%)	Concentração Bactericida Mínima	
		Faixa	Média (µg/mL)
<i>Origanum vulgare</i>	66,0 (66/100)	50 - 3200	672
<i>Rosmarinus officinallis</i>	3,0 (3/100)	1600 - 3200	1.867
<i>Piper nigrum</i>	1,0 (1/100)	-	933

Quadro 3. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com óleo essencial de orégano.

Parâmetros	Tratamentos ⁴					P*
	1	2	3	4	5	
Peso inicial (g)	3,28±0,01	3,29±0,01	3,29±0,01	3,30±0,003	3,29±0,004	0,15
Comprimento total (cm)	10,62±0,25	10,53±0,44	10,54±0,47	10,96±0,48	10,31±0,26	0,28
Comprimento padrão (cm)	8,77±0,23	8,73±0,40	9,05±0,60	9,21±0,50	8,62±0,18	0,28
Altura (cm)	3,44±0,10	3,35±0,18	3,55±0,33	3,62±0,11	3,34±0,14	0,20
Largura (cm)	1,66±0,05	1,69±0,07	1,67±0,03	1,77±0,07	1,66±0,04	0,06
FCC ¹	1,85±0,07	1,85±0,0	1,94±0,26	1,82±0,15	1,79±0,04	0,05
RCC ²	23,09±2,13	23,52±2,56	23,53±2,05	22,94±1,15	19,85±3,85	0,24
RC ³	16,99±2,18	16,83±2,36	17,77±2,17	17,18±0,60	14,54±2,60	0,29

¹Fator de condição corporal; ²Rendimento de carcaça com cabeça; ³Rendimento de carcaça sem cabeça; *P = P-valor; ⁴ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com solução salina; (2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 1,0% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (5) grupo recebendo ração contendo 1,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

Quadro 4. Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente (CAA), eficiência alimentar (EA) e consumo de ração dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo óleo essencial de orégano.

Parâmetros	Tratamentos ¹					P*
	1	2	3	4	5	
Peso final (g)	22,17±1,39	21,70±2,18 ^{ab}	24,40±1,82 ^a	23,87±1,49 ^a	19,64±1,45 ^b	0,01
Ganho de peso (g)	18,88±1,39	18,41±2,18 ^{ab}	21,11±1,82 ^a	20,57±1,49 ^a	16,35±1,45 ^b	0,01
CAA	1,65±0,13	1,74±0,10 ^b	1,42±0,20 ^a	1,52±0,12 ^{ab}	1,68±0,10 ^{ab}	0,03
EA	0,61±0,05	0,58±0,03 ^b	0,71±0,11 ^a	0,66±0,05 ^{ab}	0,59±0,03 ^{ab}	0,04
Consumo (g)	31,00±1,66	31,84±2,07 ^b	29,87±2,90 ^{ab}	31,10±1,35 ^{ab}	27,30±1,09 ^a	0,03

*P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com solução salina; (2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 1,0% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (5) grupo recebendo ração contendo 1,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

Tabela 5. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossômico (IHS) e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo óleo essencial de orégano.

Parâmetros	Tratamentos ¹					P*
	1	2	3	4	5	
Sobrevivência (%)	100±0,00	91,66±16,67	83,33±33,33	91,67±16,67	83,33±19,25	0,75
IHS	2,16±0,31	2,57±0,24	2,51±0,31	3,08±0,64	2,84±0,30	0,04
Lisozima (µg/mL)	0,81±0,61	1,31±1,16	1,15±0,90	0,70±0,98	0,81±0,42	0,84

*P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com solução salina; (2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 1,0% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (5) grupo recebendo ração contendo 1,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

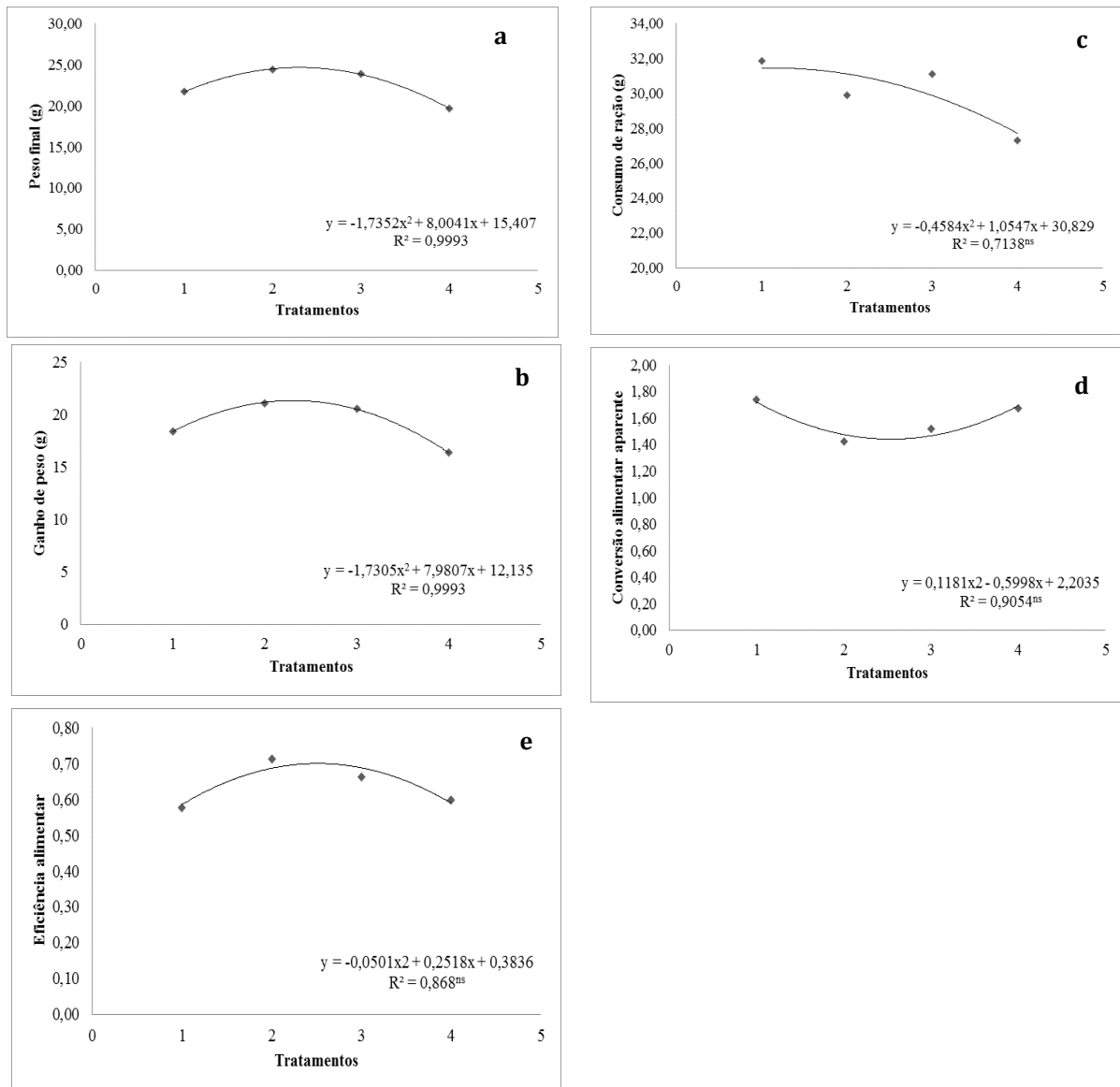


Fig.1. Parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo níveis crescentes de óleo essencial de orégano: a) peso final; b) ganho de peso; c) consumo de ração; d) conversão alimentar aparente eficiência alimentar; e) eficiência alimentar: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 1,0% de OEO inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 1,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

Artigo a ser Submetido para Sêmima Ciências Agrárias

Utilização do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito após infecção por *Aeromonas hydrophila*

Use of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* in the feed tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect after infection with *Aeromonas hydrophila*

Samira Teixeira Leal de Oliveira¹, Izabela Pinheiro de Santana Lacerda², Diego Castro Fonseca³, Gisele Veneroni-Gouveia⁴, Mateus MatiuZZi da Costa⁴

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da UFRPE, e-mail: samirazootec@yahoo.com.br

²Mestre em Ciência Animal pela UNIVASF, CCA, Petrolina, PE, Brasil, 56304-917.

³Dicente de Zootecnia da UNIVASF, CCA, Petrolina, PE, Brasil, 56304-917.

⁴Docentes de Zootecnia da UNIVASF, CCA, Petrolina, PE, Brasil, 56304-917, e-mail: gisele.veneroni@univasf.edu.br; mateus.costa@univasf.edu.br

RESUMO

O estudo avaliou o efeito de doses dietéticas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desempenho, imunidade e resistência de juvenis de tilápia do Nilo, contra infecção por *Aeromonas hydrophila*. Os alevinos (n=200) foram adaptados e selecionados para montar as unidades experimentais. Os peixes com peso médio inicial de $5,16 \pm 0,04$ g, foram distribuídos em tanques de 100 L, mantidos a aeração constante e alimentados com dieta contendo 0 (controle), 4×10^8 , 6×10^8 e 8×10^8 UFC Kg ração⁻¹ *S. cerevisiae* por 45 dias. Como fator de estresse, houve a baixa temperatura da água dos alevinos com média de $21,25 \pm 0,12^\circ$ C matutina e $23,77 \pm 0,32^\circ$ C vespertina. Trinta dias após a alimentação, os peixes foram desafiados com *A. hydrophila*, e as mortalidades foram registradas durante 15 dias pós-infecção. Os animais foram avaliados quanto ao crescimento e carcaça, além do microbioma intestinal por meio da eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE). Os resultados mostraram que a administração de *S. cerevisiae* teve efeitos significativos ($P < 0,05$) sobre o comprimento padrão, a conversão alimentar aparente e a eficiência alimentar nos alevinos de tilápia do Nilo. Para essas variáveis, não foi encontrado modelo de regressão significativo, mas pela equação gerada foi possível encontrar os pontos críticos em $5,66 \times 10^8$, $6,07 \times 10^8$ e $6,06 \times 10^8$ UFC kg⁻¹ ração respectivamente. Quanto ao microbioma intestinal, observou-se que os animais tratados apresentaram a maior diversidade bacteriana comparados ao controle. Estes resultados sugerem coletivamente, que a suplementação dietética de *S. cerevisiae* na quantidade de 6×10^8 UFC kg⁻¹ ração para tilápia do Nilo traz efeitos positivos ao desempenho dos peixes e para a adesão e colonização do probiótico até o nível de 6×10^8 UFC kg⁻¹ ração.

Palavras chave: aquicultura, aditivo alimentar, microbioma, nutrição de peixe, piscicultura

ABSTRACT

The study evaluated the effect of dietary doses of *Saccharomyces cerevisiae* on performance, immunity and resistance of juvenile Nile tilapia, against infection by *Aeromonas hydrophila*. The fry (n = 200) were selected and adapted to mount the experimental units. Fish with average weight of 5.16 ± 0.04 g, were distributed in tanks of 100 L, kept constant aeration and fed diets containing 0 (control), 4×10^8 , 6×10^8 and 8×10^8 CFU kg feed⁻¹ *S. cerevisiae* for 45 days. As stress factor was the low water temperature of fingerlings averaging 21.25 ± 0.12 ° C morning and 23.77 ± 0.32 °C evening. Thirty days after feeding, the fish were challenged with *A. hydrophila*, and mortalities were recorded during 15 days post-infection. The animals were evaluated for growth and carcass, besides the intestinal microbiome by gel electrophoresis in denaturation gradient (DGGE). The results showed that administration of *S. cerevisiae* had significant effects (P <0.05) over the standard length, feed conversion and feed efficiency in the Nile tilapia. For these variables, it not found significant regression model, but the generated equation was possible to find the critical points in $5,66 \times 10^8$, $6,07 \times 10^8$ and $6,06 \times 10^8$ CFU kg⁻¹ feed respectively. As for the intestinal microbiome, it was observed that the treated animals had the highest bacterial diversity compared to the control. These results suggest collectively that dietary supplementation of *S. cerevisiae* in the amount of 6×10^8 CFU kg⁻¹ feed for Nile tilapia bring positive effects to the performance of the fish and the adhesion and colonization of the probiotic.

Keywords: aquaculture, food additive, microbiome, fish nutrition, pisciculture

Introdução

A aquicultura é responsável por suprir uma das principais fontes de proteína de elevada qualidade e valor nutricional para população mundial. Esta vem apresentando um acelerado crescimento (CRUZ et al., 2012). Um imenso desafio será alimentar toda a humanidade, de forma saudável e acessível, além das preocupações em proteger o planeta, quanto aos seus recursos naturais para as gerações futuras. O peixe é um dos produtos mais negociados em todo o mundo, importante especialmente para países em desenvolvimento. Nesse contexto, o Brasil vem mostrando grande potencial aquícola. Regionalizando o país, o Nordeste destaca-se como o segundo maior produtor, responsável por 19,5% da produção nacional (IBGE, 2013), em virtude principalmente, de suas fontes aquíferas e clima favorável à criação de espécies tropicais. Com destaque para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie extremamente adaptada e explorada na região.

Como em todos os segmentos da agropecuária, a piscicultura tem como objetivo alcançar elevados índices de produtividade. Até a década de 90 era uma atividade apenas de baixa produtividade e subsistência, atualmente, é uma excelente indústria lucrativa (TIMMONS et al., 2002; CRESSEY, 2009). A lucratividade é crescente com a intensificação da produção, no entanto, a intensificação das

práticas em aquicultura requer o cultivo em altas densidades. Muitas vezes os criatórios ocorrem em águas da união, que pode resultar em danos significativos ao meio ambiente devido a descargas de resíduos orgânicos e neles a presença de antimicrobianos, do uso indiscriminado como promotores de crescimento ou no controle de enfermidades (WANG; XU, 2004), que geram riscos significativos para a saúde pública, promovendo a seleção, propagação e persistência de cepas bacterianas resistentes (FAO/OIE/WHO, 2006).

A necessidade de aumento da resistência a doenças, o crescimento favorável de organismos aquáticos, a eficiência alimentar, trouxe um novo conceito de nutrição otimizada, como o uso de aditivos probióticos em aquicultura. A prática da aquicultura ecológica também impulsionou as pesquisas sobre o uso de probióticos para animais aquáticos (GATESOUBE, 1999). Os probióticos são devidamente conceituados, como um ou mais micro-organismos com efeitos benéficos para o hospedeiro, capazes de persistir no trato digestivo, após seu consumo, em função da sua tolerância a sais de ácidos biliares (IRIANTO; AUSTIN, 2002), o que favorece a sua ação no trato dos animais, beneficiando a saúde e aumento da produtividade.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura, reconhecida como tendo efeitos importantes sobre as funções imuno-estimulantes (CHIU et al., 2010; REQUE et al., 2010; ABDEL-TAWWAB et al., 2008). Nessas condições o presente trabalho foi realizado para avaliar as respostas quanto ao desempenho e respostas imunológicas dos alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com doses crescentes dessa levedura desafiados com *A. hydrophila*.

Material e Métodos

Local de execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus Ciências Agrárias, localizado na Fazenda experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, situada na Rodovia BR 407, km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº “C1”, Petrolina-PE.

O experimento foi conduzido conforme protocolo nº 0006/160812, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco - CEUA/UNIVASF.

Isolados bacterianos

O isolado de *A. hydrophila* foi obtido a partir do peixe pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura (CIRPA) de Bebedouro/PE. Este isolado foi previamente identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994) e, por meio da PCR para confirmação de gênero e espécie,

segundo metodologia descrita por Ghatak et al. (2007). Fatores de virulência também foi caracterizado, sendo positivo para os genes Lipase (SEN, 2005), Elastase (CASCÓN et al., 2000) e o gene Fla (SANTOS et al., 2010).

Condições experimentais

Duzentos alevinos de tilápia do Nilo, aparentemente saudáveis, com peso médio de $5,16 \pm 0,04$ g, provenientes do CIRPA de Petrolina-PE; foram estocados em 20 caixas d'água de polietileno de 100 L de volume útil. Uma unidade experimental consistiu de uma caixa contendo dez alevinos de tilápia. O experimento teve a duração de 45 dias.

Os peixes foram adaptados e mantidos em água tratada desclorada. Material fecal e eventuais restos de ração foram removidos diariamente com a troca da água, 50% na primeira semana e 70% até o final do período experimental. Em dias alternados, fez-se a limpeza interna das paredes das caixas, a fim de controlar o crescimento de perífítons. As caixas possuíam aeração constante, por meio de soprador de ar, interligadas por mangueiras e pedras micro-porosas. Objetivando manter sua boa qualidade.

Foi testado o probiótico *Saccharomyces cerevisiae*, no qual os tratamentos consistiram de três concentrações distintas (4×10^8 , 6×10^8 e 8×10^8 UFC kg^{-1}) e um grupo controle. Desafiados com *A. hydrophila*.

A água dos tanques permaneceu a uma temperatura abaixo do conforto térmico para a espécie, usado como fator de estresse para os peixes.

Rações

Foram formuladas rações contendo 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível Kg de ração^{-1} (Tabela 1), composição e percentual das dietas de acordo com Costa et al. (2013). Para a fabricação das rações os alimentos foram moídos em peneira de 1 mm, posteriormente, foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica, e estes peletes secos em estufa de ventilação forçada por 24 horas a 35°C . Quando secas, foram quebrados e assim, adequados ao tamanho do pelete à boca dos alevinos. As rações foram armazenadas em freezer a -20°C .

O arraçoamento foi feito três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 16h00, em um nível de 6% do peso vivo dos alevinos. Semanalmente, as unidades experimentais eram pesadas para a adequação da quantidade de ração fornecida.

Saccharomyces cerevisiae

Um aditivo probiótico YEA-SACC™ 1026 (Alltech), de uso exclusivo para a alimentação animal foi utilizado no presente experimento. Um pó de coloração marrom de odor agradável, de

constituição básica *S. cerevisiae* cepa 1026 (mín.) 1×10^8 UFC g^{-1} . Os valores do aditivo nas rações testes foram de 4, 6 e 8 g Kg ração $^{-1}$. No preparo da ração, a *S. cerevisiae* foi previamente diluído em água, posteriormente misturado à fração do milho e então incorporado aos demais ingredientes.

Precedendo a fabricação das rações, foi feito um teste de resistência a temperatura pelo probiótico. Foi pesado 1 g do aditivo e diluído em 10 mL de solução salina estéril (0,5%). Os tubos foram reservados em estufa com diferentes condições de temperaturas por um período de 24 horas, exceto o controle. As temperaturas das estufas foram 30° C, 40° C e 55° C. Após esse período de incubação, foram feitas diluições seriadas em microtubos estéreis até 10^{-6} . Cultivado em meio Sabouraud em triplicata, incubados por 24 horas a 38° C. Assim feita a contagem e determinado a melhor temperatura para secagem da ração que não trouxesse danos a integridade do probiótico, que foi de 40° C.

Cultivo da ração

A partir das rações devidamente fabricadas, foram feitos cultivos para confirmação de células probióticas viáveis. Um grama de cada ração triturada foi diluído em 10 mL de solução salina estéril (0,5%). Em triplicata, usando o meio YGC (yeast growth chloramphenicol), foi cultivado o inóculo de cada concentração, então incubados por 48 horas em estufa a 38°C. Após o cultivo efetuou-se a contagem, juntamente com sua identificação morfológica e tintoriais, conforme Quinn et al. (1994).

Teste de desafio

Os peixes foram desafiados após quatro semanas experimentais, por via intramuscular latero-dorsal direita, um preparado de inóculo bacteriano, *A. hydrophila* com diluição em solução salina estéril na concentração de 10^7 UFC mL^{-1} (0,2 mL animal $^{-1}$), padronizada em espectrofotometria. Após a inoculação, os animais foram mantidos em observação por 15 dias. Os peixes mortos foram utilizados para re-isolamento bacteriano, por meio do cultivo do rim em meio TSA (*Trypticase soy Agar*).

Mensurações e análises experimentais

Os parâmetros físico químicos da água foram aferidos diariamente, quanto a temperatura, condutividade elétrica e pH da água dos aquários experimentais (medidor multiparâmetros modelo HI 9828, HANNA Instruments).

No dia antecedente ao desafio, foi feito um cultivo da água dos aquários em meio TSA, a fim de verificar a qualidade microbiológica quanto à presença de *A. hydrophila* no ambiente.

Ao final do período experimental, depois de anestesiados com benzocaína (100 mg L^{-1}) e eutanasiados por secção medular, os peixes de cada unidade experimental foram pesados e medidos para a determinação dos parâmetros de desempenho e carcaça. Dois peixes de cada unidade experimental tiveram o seu fígado extraído para a determinação do índice hepatossomático (IHS), $[(\text{peso do fígado/ peso corporal}) \times 100]$. Além disso, fragmentos de tecido hepático e intestinal foram enviados para processamento e análise histológica, conforme descrito abaixo.

Foram avaliadas as mudanças induzidas pelo tipo de aditivo alimentar sobre a microbioma intestinal, por meio de técnicas de biologia molecular DGGE e alguns parâmetros imunes não específicos, como a atividade da lisozima seguindo metodologia descrita por Ellis (1990) e Obach et al. (1993).

Análises PCR-DGGE

O DNA das bactérias presentes no intestino dos peixes antes e após o desafio sanitário, submetidos a dietas contendo ou não *S. cerevisiae* foi extraído seguindo a metodologia de Purohit e Singh (2009) com algumas modificações; com protocolo baseado na utilização de clorofórmio e álcool isoamílico e utilizado em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se $10 \mu\text{l}$ de TopTaq Master Mix (Qiagen®), $0,5 \mu\text{M}$ de cada primer universal para bactérias com grampo GC e 80 ng de DNA em um volume final de $50 \mu\text{L}$. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 60 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Ao final ocorreu uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Esses produtos de PCR foram avaliados pela técnica de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) com gradiente de 40-75% em gel de acrilamida a 8% para análise de diversidade de bactérias.

Atividade da lisozima

A análise do parâmetro imune não específico da atividade da lisozima dos animais sobreviventes foi realizada de acordo com metodologia descrita por Ellis (1990) e Obach et al. (1993), com pequenas modificações. O sangue foi centrifugado (2.000 g por 15 minutos) e o soro obtido foi mantido a -20°C . O nível de lisozima foi medido por ensaio turbidimétrico, utilizando lisozima liofilizada (2 mg mL^{-1}) de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich/L4631) como padrão. Para determinação da curva de calibração foram adicionadas diferentes concentrações de solução de lisozima diluída 1.000X até a obtenção das concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng e o volume completado para $150 \mu\text{l}$ com tampão fosfato de sódio ($0,05 \text{ M}$; $\text{pH } 6,2$), sendo também adicionado $150 \mu\text{l}$ da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$), em tampão fosfato de sódio ($0,05 \text{ M}$; $\text{pH } 6,2$), totalizando um volume final de $300 \mu\text{l}$. Como controle foi utilizado o tampão fosfato

(300µl). A redução da densidade óptica (OD) em 620nm foi avaliada entre o tempo zero e 6 minutos a 26°C e a curva de calibração para lisozima foi obtida considerando os valores da redução da OD para cada concentração versus a concentração de lisozima em um volume final de 300µl.

Posteriormente, as amostras de soro foram aquecidas (banho-maria a 56°C por 30 minutos) para inativar as proteínas do sistema complemento e para certificar que a lise do *M. lysodeikticus* foi ocasionada exclusivamente por ação da lisozima. Em microplacas de ELISA, foram adicionados 10 µL de soro, 140 µL de tampão fosfato de sódio e 150 µL de suspensão *M. lysodeikticus* (0,2 mg mL⁻¹) para completar 300 µL de volume final. Logo após, a absorbância foi medida em leitora de placa de ELISA Easys® e mensurada em filtro de 620 nm no tempo zero, e então foram incubadas durante seis minutos em estufa à 26°C. Uma amostra em branco foi preparada utilizando tampão de fosfato de sódio (300 µL). Diferença entre a turbidez inicial e final (densidade óptica (OD) de redução) foi medida entre o tempo zero e seis minutos, a 620 nm. Os resultados foram expressos usando os valores de redução de OD para cada volume da amostra (300µl). A equação de regressão linear da curva de calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima no soro (µg mL⁻¹) dos peixes.

Análise estatística

Depois de avaliados todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, lisozima, IHS, sobrevivência, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos análise de variância (One-way ANOVA). O pressuposto de homogeneidade foi verificado pelo teste Levene. Caso verificado diferença significativa ($p < 0,05$) realizou-se o teste Tukey para variâncias homogêneas e foram propostos modelos de regressão para avaliar o desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo níveis crescentes da levedura *S. cerevisiae*. Utilizou-se o *software* Statistica 5.0 para todas as análises.

Resultados

Água dos aquários e cultivo bacteriano

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram $21,25 \pm 0,12^\circ \text{C}$ e $23,77 \pm 0,32^\circ \text{C}$; $7,70 \pm 0,04$ e $7,76 \pm 0,08$; $6,44 \pm 0,16$ e $6,76 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$; $74,3 \pm 0,003$ e $78,5 \pm 0,004 \mu\text{Sm cm}^{-1}$, respectivamente. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos.

Foi confirmado a higidez da água dos aquários, em seu cultivo, não houve crescimento significativo de bactérias e nem a presença de *Aeromonas* spp. A partir do cultivo feito em meio TSA (*Trypticase soy Agar*) do rim e lesões ulcerativas dos peixes mortos em função do desafio, houve

crescimento de colônias bacterianas de gênero *Aeromonas*. Passadas duas semanas do desafio, o cultivo do rim foi realizado e não foi observado crescimento significativo de colônias.

Após o desafio com *A. hydrophila*, os peixes apresentaram perda de equilíbrio, movimentos respiratórios lentos e ascite, além da ocorrência de mortalidade. Sinais clínicos também encontrados corresponderam à erosão de nadadeiras e perdas de escamas, lesões ulcerativas, principalmente nas proximidades do local de inoculação e músculo caudal, além de exoftalmia.

Crescimento, conversão alimentar, eficiência alimentar e fator de condição corporal

Os efeitos de tratamentos de dieta sobre o desempenho de crescimento da tilápia do Nilo estão apresentados na Tabela 2. As médias de peso inicial, peso final, ganho de peso e fator de condição corporal (FCC) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em função do aumento dos níveis de *S. cerevisiae* ($P > 0,05$) nas rações.

A conversão alimentar aparente (CAA) e a eficiência alimentar (EA) não apresentaram modelo significativo ($p > 0,05$) na regressão (Figura 1 e 2). Todavia, a partir da equação foi possível identificar o ponto de mínima para a CAA de $6,07 \times 10^8$ UFC kg^{-1} e máxima para a EA de $6,06 \times 10^8$ UFC kg^{-1} .

No teste de médias (Tabela 2), a EA no grupo alimentados com 6×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em comparação ao controle e o tratamento 2, não diferindo do tratamento 4. A CAA também apresentou uma melhora significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle e tratamento 2.

Características e rendimento de carcaça

Os valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos às rações contendo níveis crescentes de *S. cerevisiae* desafiados com *A. hydrophila* encontram-se na Tabela 3. O comprimento total, largura, altura, rendimento de carcaça com e sem cabeça e o consumo total de ração não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) em função dos tratamentos.

O comprimento padrão apresentou uma melhora significativa ($P < 0,05$) no tratamento 3 em comparação ao grupo controle (Tabela 4). Para esse parâmetro também não foi encontrado modelo significativo ($p > 0,05$) na regressão (Figura 3), embora, foi possível identificar o ponto máxima pela equação de $5,66 \times 10^8$ UFC kg^{-1} .

Sobrevivência, índice hepatossomático, lisozima e PCR-DGGE

Todas as unidades experimentais durante o período antecedente ao desafio sanitário permaneceram com 100% de sobrevivência. Após o desafio com *A. hydrophila*, a percentagem de sobrevivência (Tabela 4) foi maior no tratamento 3, mas não apresentou diferença significativa ($P>0,05$). Os valores médios de índice hepatossomático e lisozima sérica do sangue também não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$) em função da *S. cerevisiae*.

A curva de calibração de lisozima apresentou alta correlação linear ($r^2 = 0,978$) entre 50 e 300 ηg de lisozima por microlitro.

A Figura 4 refere-se ao perfil da microbiota intestinal das tilápias, alimentadas ou não com dietas probióticas antes e após o desafio com *A. hydrophila*. A partir da análise do PCR-DGGE foi possível observar que antes do desafio (Figura 4a), os tratamentos submetidos as dietas contendo *S. cerevisiae* apresentaram uma maior diversidade microbiana em comparação ao grupo controle; após o desafio com *A. hydrophila* (Figura 4b), observou-se que o grupo submetido a dieta contendo 8×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* se destacou com a maior diversidade, enquanto que os demais tratamentos se apresentaram semelhantes (Figura 4b).

Discussão

O desempenho dos peixes foi avaliado após 30 dias de alimentação com dietas contendo doses crescentes do probiótico *S. cerevisiae*. Foram observadas diferenças significativas favoráveis entre os tratamentos testes e o grupo controle para a conversão alimentar, eficiência alimentar e comprimento padrão. Pelo teste de médias, o tratamento 3 (6×10^8 UFC kg^{-1}) se destacou com os melhores valores em comparação ao controle. Verificados por meio da equação de regressão que determinou a dose 6×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* melhor resposta em função dos tratamentos. Abdel-Tawwab (2012), a partir do fornecimento de doses crescentes (0-5 g kg ração⁻¹) de *S. cerevisiae* demonstraram que o melhor tratamento para o crescimento da tilápia do Nilo foi de 2,0 g kg de ração⁻¹. Efeitos positivos no crescimento podem ser atribuídos à assimilação de nutrientes na dieta, como exemplo, um aumento na disponibilidade de substratos metabólicos como vitaminas (LEBLANC et al., 2011) ou enzimas digestivas (BAIRAGI et al., 2002), produzido pelo microbioma dos hospedeiros. Os resultados aqui descritos também corroboram com Lara-Flores et al. (2003) e Abu-Elala et al. (2013), que ao estudar a alimentação probiótica para tilápias, obtiveram uma melhora no crescimento e eficiência alimentar, sugerindo que *S. cerevisiae* promove o crescimento adequado na criação de tilápias. Waché et al. (2006) em trutas encontraram uma melhor digestibilidade dos nutrientes e De Schrijver e Ollevier (2000) relataram um efeito positivo sobre digestão de proteínas.

O experimento foi realizado em uma temperatura inferior ao considerado como de conforto térmico para a tilápia do Nilo (KUBITZA, 2003), sendo esta um fator de estresse. Prejuízos no crescimento e eficiência alimentar podem ocorrer com baixas temperaturas da água (EL-SAYED, 2006). Esse efeito foi observado na presente pesquisa, relativos aos valores elevados da conversão alimentar e reduzido crescimento dos peixes experimentais. Fora da sua homeostase, os animais tornam-se ainda mais vulneráveis às enfermidades (SUN et al., 1992; JUSTI et al., 2005). São nessas oportunidades que bactérias como *A. hydrophila* apresentam maior atividade (JANDA; ABBOTT, 2010). Notoriamente, na atual pesquisa, a mortalidade após a inoculação de *A. hydrophila* foi elevada (77%). Numericamente, a sobrevivência no tratamento controle foi menor, embora não houvesse proteção contra a bactéria em função do alimento funcional fornecido, fato este confirmado também pela ausência de significância estatística para a lisozima sérica entre os tratamentos. Os achados de Abdel-Tawwab et al. (2008) e Abdel-Tawwab (2012) após desafiar os peixes com *A. hydrophila* com uma dose considerada sub-letal, demonstraram que a mortalidade foi reduzida de forma significativa de acordo com o aumento dos níveis de levedura na ração. Lara-Flores et al. (2003) propondo uma elevada densidade de cultivo como fator de estresse experimental, também verificaram redução significativa na sobrevivência no grupo controle em comparação aos grupos que recebiam probiótico na ração, o que difere do observado no presente estudo. Por outro lado, no presente experimento, foi verificada atenuação dos efeitos do estresse térmico após a alimentação com *S. cerevisiae* (6×10^8 UFC kg^{-1}) indicada pelos parâmetros de desenvolvimento superiores em relação ao grupo controle, sendo essa mesma dose o ponto de superioridade encontrado nas equações de regressão.

Também não foram observadas diferenças significativas no peso final e ganho de peso entre os tratamentos no presente experimento, embora as médias dos peixes tratados tenham sido superiores ao controle. Especula-se que seja necessário um maior tempo experimental para avaliação destes parâmetros. Ramos et al. (2013) verificaram em seu trabalho com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), que dietas probióticas produziram efeito positivo apenas após 56 dias de alimentação.

Na presente pesquisa foi possível observar ainda pelo PCR-DGGR, mudanças induzidas pelo aditivo alimentar sobre o microbioma intestinal. Os peixes que consumiram na dieta o probiótico *S. cerevisiae*, tiveram uma maior diversidade microbiana em comparação ao grupo controle, visto pelo maior número de bandas no gel. Os probióticos podem contribuir para um maior equilíbrio do microbioma intestinal dos peixes, garantindo assim, uma maior diversidade taxonômica e funcional (CRUZ et al., 2012), auxiliando positivamente para a melhora do desempenho.

O tratamento 4 (8×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae*), referente à maior dose do probiótico utilizado, por meio da regressão foi possível observar uma tendência para uma queda de desempenho. Fato este que foi curiosamente observado por Ramos et al. (2013) quando os peixes foram alimentados com 3 g kg^{-1} comparados a 1,5 g kg^{-1} de uma multimistura de probióticos. Os mesmos autores apontaram ainda uma menor diversidade no microbioma dos peixes experimentais. Hipóteses têm sido levantadas que doses elevadas podem anular os efeitos preventivos, por perturbar o ecossistema microbiano

estabelecido, podendo interferir com as respostas imunes (LI et al., 2012), o que possivelmente pode ter ocorrido na presente pesquisa. Por meio da PCR-DGGE, foi possível verificar ainda que o tratamento 4, após o desafio com *A. hydrophila*, diferente dos demais grupos, apresentou uma maior diversidade microbiana, o que nos leva a crer, em função da queda no seu desempenho, que o trato gastrointestinal estaria colonizado por bactérias consideradas não benéficas. O fato em evidência a necessidade de encontrar o limite do aditivo probiótico a ser fornecido sem trazer prejuízos no metabolismo e/ou resistência ao estresse e enfermidades, uma vez que doses muito baixas também não são suficientes a fim de melhorar o desempenho dos animais (MEURER et al., 2007; MEURER et al., 2008). As respostas observadas no desempenho com dietas suplementadas com probióticos, sugerem que a adição da *S. cerevisiae* melhorou a utilização do alimento, mesmo sob condições de estresse.

Conclusões

O probiótico (*S. cerevisiae*) testado provoca mudanças no microbioma intestinal da tilápia do Nilo, contribuindo para uma melhor diversidade até o nível de 6×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae*, assim como provoca efeitos positivos sobre o desempenho dos mesmos, indicando seu potencial uso na alimentação de peixes.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e a CODEVASF-PE pela importante parceria.

Referências bibliográficas

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN. A. M.; ISMAEL, N. E. M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, v. 280, p.185–189, 2008.

ABDEL-TAWWAB, M. Interactive effects of dietary protein and live bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry and their challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Int*, v. 20, p. 317–331, 2012.

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 1, p. 21–29, 2013.

BAIRAGI, A.; SARKAR GHOSH, K.; SEN, S.K.; RAY, A.K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture*, v. 10, p. 109–121, 2002.

CASCON, A.; YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; SÁNCHEZ, M.; HERNANZ, C.; LUENGO, J. M.; NAHARRO, G. A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and immunity*, v. 68, n. 6, p. 3233–3241, 2000.

CHIU, C.-H.; CHENG, C.-H.; GUA, W.-R.; GUU, Y.-K.; CHENG, W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, n. 29, p. 1053-1059, 2010.

COSTA, M. M.; OLIVEIRA, S. T. L.; BALEN, R. E.; BUENO JUNIOR, G.; BALDAN, L. T.; SILVA, L. C. R.; SANTOS, L. D. Brown seaweed meal to Nile tilapia fingerlings. *Archivos de Zootecnia*, v. 62, n. 237, p. 109, 2013.

CRESSEY, D. “Aquaculture: future fish.” *Nature*, vol. 458, n. 7237, p. 398–400, 2009.

CRUZ, P.; IBÁÑEZ, A. L.; HERMOSILLO, O. A. M.; SAAD, H. C. R. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network (ISRN Microbiology)*, Article ID 916845, p. 13, 2012.

DE SCHRIJVER, R., OLLEVIER, F., Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*. n. 186, p. 107– 116, 2000.

ELLIS, A.E. Lysozyme assay. In: Stolen JS, Fletcher DP, Anderson BS, Robertson BS, editors. *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publication; p. 101-3, 1990.

EL-SAYED, A.M. Tilapia culture. *CABI Publishing*, Oxford, 277 pp., 2006.

FAO (2014) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014: Oportunidades y desafíos (in Spanish). Food and Agriculture Organization of United Nations, Roma. p. 274.

FAO/OIE/WHO, “Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance,” Report of a Joint. Expert Consultation on Antimicrobial Use in aquaculture and antimicrobial resistance, Seoul, Republic of Korea, p. 107, 2006.

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

GHATAK, S.; AGARWAL, R.K.; BHILEGAONKAR, K.N. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, p.550-554, 2007.

HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RING, E.; YOON, I. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂) cultured in cages. *Aquaculture*, v. 294, p. 99–107, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, ISSN 0101-4234, v. 41, p.1-108, 2013. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. “Probiotics in aquaculture”. *Journal of Fish Diseases*, v. 25, n. 11, p. 633–642, 2002.

JANDA, J. M.; E ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JUSTI, K. C.; PADRE, R. G.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Efeito da temperatura da água sobre desempenho e perfil de ácidos graxos de tilápia do Nilo (*Oerochromis niloticus*), *Acta Science Animal*, v.27, n.4, p. 529-534, 2005.

KUBITZA, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundáí, SP – Brasil, ed. 1, p. 229, 2003.

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

LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; DEL VALLE, M. J.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANT, M. P.; DE VALDEZ, G. F.; GIORI, G. S.; SESMA, F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, p. 1297–1309, 2011.

LI, X. Q.; ZHU, Y. H.; ZHANG, H. F.; YUE, Y.; CAI, Z. X.; LU, Q. P.; ZHANG, L.; WENG, X.G.; ZHANG, F.J.; ZHOU, D.; YANG, J.C.; WANG, J. F. Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: intestinal microbiota and immune imbalances. *PLoS One* 7 (7): e40666, 2012.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M.; FRECCIA, A.; MAUERWERK, M. T. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-nilo submetidos a desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 5, p. 1219-1224, 2007.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M.; MASCIOLI, A. S.; COLPINI, L. M. S.; FRECCIA, A. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde Produção Animal*, v.9, n.4, p. 804-812, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M2-A7. Wayne, NCCLS, 2000.

OBACH, A.; QUENTEL, C.; BANDIN, L.F. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.15, p. 175-85, 1993.

PUROHIT, M.K.; SINGH, S.P.; Assessment of various methods for extraction of metagenomics DNA from saline habits of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity. In: *Letters in Applied Microbiology*, 49, p.338-344, 2009.

QUINN, P.J.; CARTEY, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Aeromonas, Plesiomonas and Vibrio species* In.: *Microbiology Veterinary Clinical*, Virginia-USA, Sec. 2, Cap. 20, p. 243-247, 1994.

RAMOS, M. A.; WEBER, B.; GONÇALVES, J. F.; SANTOS, G. A.; REMA, P.; OZÓRIO, R. O. A. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 166, p. 302–307, 2013.

REQUE, V. R.; MORAES, J. R. E.; BELO, M. A. A.; MORAES, F. R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture*, n. 300, p. 37–42, 2010.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C. *Tabelas Brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais*. Editora UFV, Viçosa, p.141, 2000.

SANTOS, P.G.; SANTOS, P. A.; BELLO, A. R.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. *Applied Microbiology*, n. 52, p. 49-55, 2010.

SEN, K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, p. 51: 957-966. 2005.

SUN, L.T.; CHEN, G.R.; CHANG, C.F. The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures, *Journal of Thermal Biology*, n. 17, p. 149-153, 1992.

TIMMONS, M.; EBELING, J.; WHEATON, F.; SUMMERFELT, S.; VINCI, B. *Recirculating Aquaculture Systems, Cayuga Aqua Ventures*, 2nd edition, 2002.

WACHÉ, Y., AUFFRAY, F., GATESOUBE, F.J., ZAMBONINO, J., GAYET, V., LABBÉ, L., QUENTEL, C. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258, 470–478, 2006.

WANG, Y. B.; XU, Z. R. “Probiotics treatment as method of biocontrol in aquaculture,” *Feed Research*, vol. 12, pp. 42–45, 2004.

Tabelas e figuras

Tabela 1. Composição das rações experimentais³

Ingredientes ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFC. Kg ração ⁻¹			
	0	4x10 ⁸	6x10 ⁸	8x10 ⁸
Farelo de soja	70,79	70,79	70,79	70,79
Milho	16,70	16,70	16,70	16,70
Óleo de soja	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicálcico	2,80	2,80	2,80	2,80
Calcário calcítico	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> g.kg ⁻¹	0,00	4,0	6,0	8,0
Suplemento mineral e vitamínico ²	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,50	0,50	0,50	0,50
Butil hidroxi tolueno (BHT)	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ De acordo com Rostagno et al. (2000); ² Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ác. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg. ³Costa et al. (2013).

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente (CAA), eficiência alimentar (EA) e fator de condição corporal (FCC) dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo níveis crescentes do probiótico *S. cerevisiae*.

Parâmetros	Tratamentos ¹				P*
	1	2	3	4	
Peso inicial (g)	5,17±0,03	5,16±0,04	5,16±0,03	5,15±0,06	0,88
Peso final (g)	13,23±1,01	13,14±0,93	14,17±0,39	13,44±0,22	0,14
Ganho de peso (g)	8,06±1,02	7,98±0,91	9,01±0,41	8,29±0,24	0,14
CAA	2,33±0,23 ^b	2,26 ±0,19 ^b	1,95±0,11 ^a	2,18±0,03 ^{ab}	0,01
EA	0,43±0,04 ^b	0,44±0,04 ^b	0,51±0,03 ^a	0,46±0,01 ^{ab}	0,01
FCC	1,82±0,14	1,69±0,05	1,69±0,10	1,72±0,03	0,09

*P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*

Figura 1. Conversão alimentar aparente dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico *S. cerevisiae*: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*

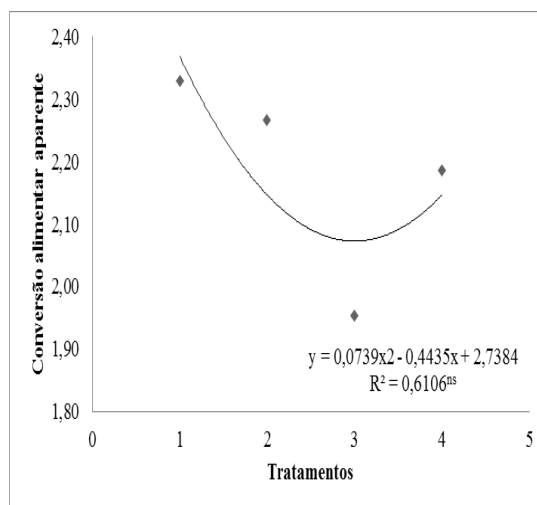


Figura 2. Eficiência alimentar dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico *S. cerevisiae*: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*

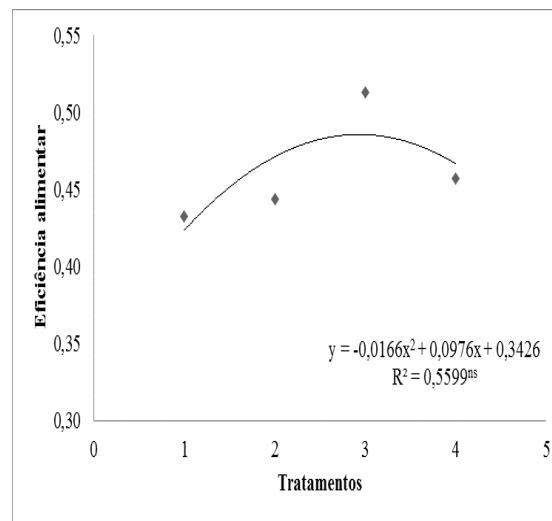


Tabela 3. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados *S. cerevisiae*.

Parâmetros	Tratamentos ³				P*
	1	2	3	4	
Comprimento total (cm)	8,99±0,37	9,19±0,14	9,44±0,25	9,21±0,08	0,06
Comprimento padrão (cm)	7,54±0,19 ^b	7,65±0,14 ^{ab}	7,93±0,24 ^a	7,66 ±0,08 ^{ab}	0,01
Altura (cm)	2,53±0,19	2,50±0,09	2,62±0,09	2,59±0,04	0,35
Largura (cm)	1,33±0,08	1,28±0,03	1,34±0,03	1,30±0,02	0,20
RCC ¹	13,88±0,75	13,68±1,48	14,10±2,23	13,51±1,61	0,94
RC ²	10,22±0,79	10,23±1,15	10,47±1,75	10,19±1,32	0,99
Consumo de ração (g)	8,99±0,37	9,19±0,14	9,44±0,25	9,21±0,08	0,06

¹Rendimento de carcaça com cabeça; ²Rendimento de carcaça sem cabeça; ³índice hepatossomático; *P = P-valor;

¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg^{-1}

¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*.

Tabela 4. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossomático (IHS) e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo *S. cerevisiae* desafiados com *A. hydrophila*

Parâmetros	Tratamentos ¹				P*
	1	2	3	4	
Sobrevivência (%)	30,00±13,94	40,00±19,00	43,33±19,00	40,00±36,51	0,83
IHS	2,37±0,25	2,40±0,31	2,12±0,47	2,01±0,38	0,29
Lisozima (µg/mL)	1,76±0,75	1,67±0,68	2,00±0,31	1,64±0,52	0,77

*P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*.

Figura 3. Comprimento padrão dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico *S. cerevisiae*: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg⁻¹ *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*

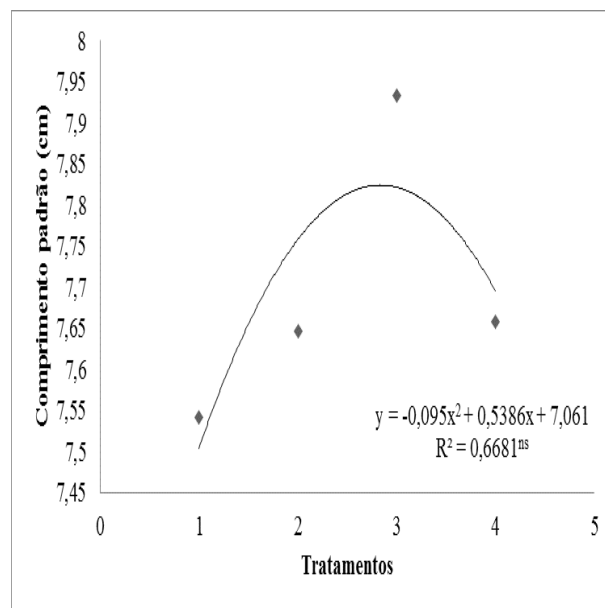
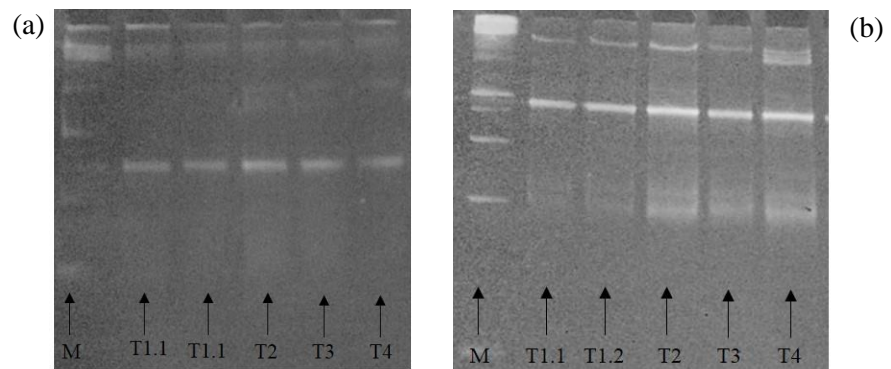


Figura 4. Análise de PCR-DGGE do intestino dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes do probiótico *S. cerevisiae* (a) antes do desafio, (b) após o desafio: (M) marcador molecular; (T1.1) grupo recebendo ração testemunha; (T1.2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (T2) grupo recebendo ração contendo 4×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (T3) grupo recebendo ração contendo 6×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*; (T4) grupo recebendo ração contendo 8×10^8 UFC kg^{-1} *S. cerevisiae* inoculados com *A. hydrophila*



Artigo a ser Submetido para Ciência Rural

Produtos naturais como alimentos funcionais para a tilápia do Nilo desafiadas com

Aeromonas hydrophila

Natural products as functional foods for Nile tilapia challenged with

***Aeromonas hydrophila* (em inglês)**

Samira Teixeira Leal de Oliveira^I, Sílvia Maria de Negreiros Sousa^{II}, Valdenice Félix da Silva^{III}, Gisele Veneroni-Gouveia^{IV}, Mateus Matiuzzi da Costa^{IV}

RESUMO

Alimentos funcionais empregam ingredientes cuja finalidade não é necessariamente suprir uma eventual carência nutricional, mas sim oferecer benefícios à saúde dos seres humanos e animais. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou investigar o uso de óleo essencial de orégano (OEO) e extrato etanólico de própolis (EEP) como alimentos funcionais para tilápias do Nilo desafiadas com *Aeromonas hydrophila*. Foram utilizados alevinos ($7,67 \pm 0,86$ g de peso médio inicial), aparentemente saudáveis, selecionados e distribuídos em aquários contendo 60 L, com boa qualidade de água. Os tratamentos propostos constituíram do uso dos ingredientes nas rações: EEP na quantidade de $2,22 \text{ g kg ração}^{-1}$ (tratamento 2), OEO 0,5 % Kg ração^{-1} (tratamento 3) e uma ração testemunha (tratamento 1), com sete repetições. Após 30 dias de alimentação, os animais foram submetidos ao desafio e observados por 15 dias. Os animais foram avaliados quanto aos parâmetros de desempenho, além do microbioma intestinal por meio da eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE). No crescimento, a altura, largura e rendimento de carcaça o OEO foi superior ao grupo controle ($p < 0,05$). O mesmo comportamento ocorreu para a conversão alimentar aparente e a eficiência alimentar ($p < 0,05$). No peso final, ganho de peso e fator de condição

corporal, os grupos com alimento funcional foram iguais e superiores ao controle. Não houve influência do OEO e EEP nos níveis séricos de lisozima e na sobrevivência após desafio, enquanto que na análise do PCR-DGGE, observou-se que os animais tratados apresentaram a maior diversidade microbiana quando comparados ao controle. Os dois aditivos naturais não mostraram efeito na imunidade, contudo, causaram efeito como promotores de crescimento e sobre o microbioma intestinal.

Palavras chave: aditivos alimentares, própolis, orégano, piscicultura, desafio bacteriano, microbioma

ABSTRACT

Functional foods employ ingredients whose purpose is not necessarily meet any nutritional deficiency, but to provide benefits to the health of humans and animals. In this context, this study aimed to investigate the use of oregano essential oil (OEO) and ethanol extract of propolis (EEP) as functional food for Nile tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*. Fingerlings were used (7.67 ± 0.86 g initial weight), apparently healthy, selected and distributed in aquariums containing 60 L, with good water quality. The treatments were proposed the use of ingredients in the feed: EEP in the amount 2.22 g kg^{-1} diet (treatment 2), 0.5% OEO kg feed^{-1} (treatment 3) and a control diet (Treatment 1) with seven repetitions. After 30 days feeding, animals were subjected to challenge and were observed for 15 days. The animals were evaluated for performance parameters, and intestinal microbiome by gel electrophoresis in denaturation gradient (DGGE). Growth, height, width and carcass yield OEO was higher than the control group ($p < 0.05$). The same behavior occurred for feed conversion and feed efficiency ($p < 0.05$). In the final weight, weight gain and body condition factor, the functional food groups were equal and higher than the control. No influence of OEO EEP and lysozyme in serum and survival after challenge, whereas the PCR-DGGE

analysis, it was observed that the treated animals showed the highest microbial diversity when compared to control. Both natural additives showed no effect on immunity, however, had an effect as growth promoters and the intestinal microbiome.

Keywords: food additives, propolis, oregano, fish farming, bacterial challenge, microbiota

INTRODUÇÃO

A produção piscícola nacional apresentou um crescimento total de 15,7%, nos últimos anos, alcançando 1.240.813 toneladas em 2009, das quais 39% (132 mil toneladas/ano) foi proveniente da tilapicultura (MPA, 2010). O país apresenta este crescimento na produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*), devido ao clima propício, disponibilidade de água continental e por apresentar demanda de comércio nas diferentes regiões. Apesar disso, ainda há necessidade de maior exploração científica da espécie quando comparamos aos avanços tecnológicos para produção de ruminantes, suínos e aves (FRACALOSSO & CYRINO 2012).

Para atender os índices de crescimento e expansão da tilapicultura brasileira, torna-se necessário o emprego de práticas produtivas que venham suprir a demanda por proles em quantidade e com qualidade (TSADIK & BART, 2007). Sendo assim, o sistema de produção intensiva é o mais comum. Junto a este sistema, surgem os problemas de enfermidades principalmente ocasionados por *Aeromonas spp.* que afetam significativamente a produção (COSTA, 2003).

O uso de antibióticos para prevenção e tratamento das bacterioses é uma prática existente, pois também, atuam como promotores de crescimento. Porém tem gerado uma preocupação devido ao aparecimento de bactérias resistentes a tais compostos, pois a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras que nunca foram expostas a tal

antibiótico (FAO, 2010). Este fato pode afetar diretamente a saúde dos animais e seres humanos (CITARASU, 2010). Com isso é limitado o uso de antibactericida no tratamento de peixes, além de existir poucos fármacos antimicrobianos de escolha para aquicultura (GUARDABASSI, 2010).

Buscando alternativas para substituir o uso de antibióticos na produção animal, alguns autores estão usando produtos naturais, dentre eles a própolis e os óleos essenciais. A própolis é um produto apícola e dele retirado o extrato etanólico da própolis, ambos conhecidos pelos seus efeitos benéficos garantidos pela presença de flavonóides, compostos fenólicos provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos, e exercem função antimicrobiana (BARBOSA et al., 2009). A atividade antimicrobiana também é encontrada em alguns óleos essenciais, dentre estes, o orégano (*Origanum vulgare*) (BUSATTA et al., 2007; EKREN et al., 2013).

Alguns autores mostram que o uso da própolis é recomendado como antioxidante (TALAS E GULHAN, 2009), anti-inflamatório, antiviral (VIUDA-MARTOS, 2008), antibacteriano (AZZA E ABD-EL-RHMAN, 2009) além de ser imunoestimulante (CHU, 2006; DENG et al., 2011; YONAR et al., 2011). Não diferente, o óleo essencial de orégano age também como promotor de crescimento em lambaris (FERREIRA et al., 2014), em bagres (ZHENG et al., 2012) e em aves (HONG et al., 2012).

Nesse sentido, objetivou-se no presente estudo, investigar o uso de óleo essencial de orégano e extrato etanólico de própolis como alimento funcional frente a infecção por *A. hydrophila*, na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus Ciências Agrárias, localizado na Fazenda experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, situada na Rodovia BR 407, km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº “C1”, Petrolina-PE.

O presente experimento foi conduzido conforme protocolo nº 0006/160812, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco - CEUA/UNIVASF, de janeiro de 2013.

Isolados bacterianos

O isolado de *A. hydrophila* foi obtido a partir do peixe pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura (CIRPA) de Bebedouro/PE. Este isolado foi previamente identificado por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994) e, por meio da PCR para confirmação de gênero e espécie, segundo metodologia descrita por Ghatak et al. (2007). Fatores de virulência também foi caracterizado, sendo positivo para os genes Lipase (SEN, 2005), Elastase (CASCÓN et al., 2000) e o gene Fla (SANTOS et al., 2010).

Condições experimentais

Alevinos de tilápia do Nilo revertidos foram obtidos do CIRPA de Petrolina –PE. Os peixes foram aclimatados em tanque de 1000 L com aeração constante e, alimentados com uma dieta controle (sem aditivo), por uma semana antes do experimento. Para montar as unidades experimentais foram selecionados 126 alevinos e distribuídos em 21 aquários contendo 60 L de volume útil com peso médio inicial de $7,68 \pm 0,08g$. A unidade experimental, foi considerada um aquário contendo 6 alevinos.

Os tratamentos, visando testar os aditivos naturais, foram constituídos de grupos que receberam o extrato etanólico de própolis (EEP) na quantidade de $2,22 g kg \text{ ração}^{-1}$ (MEURER et al., 2009), o óleo essencial de orégano (OEO) $0,5 \% Kg \text{ ração}^{-1}$ ($5 g Kg \text{ ração}^{-1}$)

e uma ração testemunha, com sete repetições. Desafiados com *A. hydrophila*. O regime alimentar proposto foi mantido até o final do período experimental, com duração de 45 dias.

A água dos aquários foi diariamente sifonada, uma vez pela manhã (7h00) e outra à tarde (16h00), com a remoção de cerca de 40%. Também foram retirados materiais fecais e eventuais restos de ração, controlando assim a qualidade. Semanalmente foi realizada uma limpeza interna das paredes dos aquários, para o controle de crescimento de perifítons. Os aquários possuíam aeração constante, por meio de pedras microporosas ligadas a minicompressores de ar.

Rações

Três dietas foram confeccionadas, contendo 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível. Kg de ração⁻¹ (Tabela 1), composição e percentual das dietas de acordo com COSTA et al. (2013). Para a sua fabricação os alimentos foram moídos em peneira de 1 mm, posteriormente foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica, e os peletes secos em estufa de ventilação forçada por 24 horas a 45° C. Os alimentos funcionais foram previamente misturados ao óleo de soja e então misturado aos demais ingredientes. Quando secos, foram quebrados e assim, adequado o tamanho do pelete à boca dos alevinos, então armazenadas em freezer a -20° C.

O manejo alimentar preconizado foi de um arraçoamento feito três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 17h00, em um nível de 8% do peso vivo dos alevinos. Semanalmente, as unidades experimentais foram pesadas para a adequação da quantidade de ração fornecida.

Óleo essencial de orégano

Foi utilizado o óleo essencial de orégano (OEA) comercial (QUINARÍ), de coloração marrom-avermelhada, extraído pelo método de destilação por arraste a vapor da erva florida da planta. Apresenta como componente majoritário o carvacrol (65% no mínimo) segundo o fabricante e, de acordo com os achados por VIANA, 2013 em análise em CG-EM do mesmo

óleo, entre os fitoconstituíntes, o carvacrol apresentou-se como majoritário do óleo essencial com 67,97 % do total de constituintes presentes, seguido por p-cimeno (11,67 %), γ -terpineno (7,92 %), timol (7,84 %) e linalol (3,44 %), para o mesmo fabricante.

Extrato de própolis

Foi utilizado no experimento um extrato etanólico de própolis comercial, composto de própolis diluída em álcool neutro grau alimentício e água purificada, proveniente do Estado de São Paulo. O extrato foi submetido à caracterização fitoquímica, a fim de garantir os teores dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais na amostra, constando de 126,22 mg (12,62%), equivalente de ácido gálico por grama de extrato de própolis, e de 51,06 mg (5,10%) equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis (AMARANTE, 2011).

Teste de desafio

Após quatro semanas de alimentação, os peixes foram desafiados por meio de um preparado de inóculo bacteriano (*A. hydrophila.*) com diluição em solução salina estéril a concentração de 10^7 UFC/mL, padronizada em espectrofotometria. Essa solução foi injetada via intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe experimental, foi aplicada na proporção de 0,2 mL animal⁻¹, no tratamento testemunha. Após a inoculação os animais foram mantidos em observação por 15 dias. Os peixes mortos foram utilizados para re-isolamento bacteriano.

Mensurações e análises experimentais

Os parâmetros físico químicos da água, foram aferidos diariamente, quanto a concentração de oxigênio, temperatura, condutividade elétrica e pH da água dos aquários experimentais (medidor multiparâmetros modelo HI 9828, HANNA Instruments).

Dia antecedente ao desafio, foi feito um cultivo da água dos aquários em meio TSA, a fim de verificar a qualidade microbiológica quanto à presença de *Aeromonas spp.* no ambiente.

Ao final do período experimental, depois de anestesiados com benzocaína (100mg/L) e eutanasiados por secção medular, os peixes de cada unidade experimental foram pesados e medidos para a determinação dos parâmetros de desempenho e carcaça. Dois peixes de cada unidade experimental tiveram o seu fígado extraído para a determinação do índice hepatossomático (IHS), [(peso do fígado/ peso corporal)x100] e de um deles foi feito cultivo bacteriano do rim em meio ágar Triptona de Soja (TSA).

Foram avaliadas as mudanças induzidas pelo tipo de aditivo alimentar sobre a microbiota intestinal, por meio da eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE); e alguns parâmetros imunes não específicos, como a atividade da lisozima seguindo metodologia descrita por ELLIS (1990) e OBACH et al. (1993).

Análises PCR-DGGE

O DNA das bactérias presentes no intestino dos peixes submetidos às essas dietas foi extraído seguindo a metodologia de PUROHIT e SINGH (2009) com algumas modificações; com protocolo baseado na utilização de clorofórmio e álcool isoamílico e utilizado em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se 10 µl de TopTaq Master Mix (Qiagen®), 0,5 µM de cada primer universal para bactérias com grampo GC e 80 ng de DNA em um volume final de 50 µL. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial de 95° C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 92° C por 60 segundos, anelamento a 55° C por 60 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos. Ao final ocorreu uma extensão final de 72° C por 10 minutos. Esses produtos de PCR foram avaliados pela técnica de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) com gradiente de 40-75% em gel de acrilamida a 8% para análise de diversidade de bactérias.

Atividade da lisozima

A análise do parâmetro imune não específico da atividade da lisozima dos animais sobreviventes foi realizada de acordo com metodologia descrita por ELLIS (1990) e OBACH

et al. (1993), com pequenas modificações. O sangue foi centrifugado (2.000 g/15 min) e o soro obtido foi mantido a -20°C. O nível de lisozima foi medida por ensaio turbidimétrico, utilizando lisozima liofilizada (2mg/mL) de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich/L4631) como padrão. Para determinação da curva de calibração foram adicionadas diferentes concentrações de solução de lisozima diluída 1.000X até a obtenção das concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng e o volume completado para 150µl com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), sendo também adicionado 150µl da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2mg/ml), em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), totalizando um volume final de 300µl. Como controle foi utilizado o tampão fosfato (300µl). A redução da densidade óptica (OD) em 620nm foi avaliada entre o tempo zero e seis minutos a 26°C e a curva de calibração para lisozima foi obtida considerando os valores da redução da OD para cada concentração versus a concentração de lisozima em um volume final de 300µl.

Posteriormente, as amostras de soro foram aquecidas (banho-maria a 56°C por 30 minutos) para inativar as proteínas do sistema complemento e para certificar que a lise do *M. lysodeikticus* foi ocasionada exclusivamente por ação da lisozima. Em microplacas de ELISA, foram adicionados 10 µL de soro, 140 µL de tampão fosfato de sódio e 150 µL de suspensão *M. lysodeikticus* (0,2 mg/mL) para completar 300 µL de volume final. Logo após, a absorbância foi medida em leitora de placa de ELISA Easys® e mensurada em filtro de 620 nm no tempo zero, e então foram incubadas durante seis minutos em estufa à 26° C. Uma amostra em branco foi preparada utilizando tampão de fosfato de sódio (300 µL). Diferença entre a turbidez inicial e final (densidade óptica (OD) de redução) foi medida entre o tempo zero e seis minutos, a 620 nm. Os resultados foram expressos usando os valores de redução de OD para cada volume da amostra (300µl). A equação de regressão linear da curva de calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima no soro (µg/mL) dos peixes.

Análise estatística

Depois de avaliados todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, sobrevivência, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos análise de variância (One-way ANOVA). O pressuposto de homogeneidade foi verificado pelo teste Levene. Quando verificando efeito significativo ($p < 0,05$), realizou-se o teste Tukey caso pelo software Statistica 5.0.

RESULTADOS

Água dos aquários e cultivo bacteriano

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram $27,50 \pm 0,04^\circ \text{C}$ e $28,11 \pm 0,07^\circ \text{C}$; $6,87 \pm 0,03$ e $6,64 \pm 0,05$; $6,68 \pm 0,06$ e $6,25 \pm 0,06 \text{ mg/L}$; $67,68 \pm 0,03$ e $86,10 \pm 0,07 \mu\text{Sm/cm}$, respectivamente. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos. Confirmou-se a higienidade da água, não havendo crescimento de *Aeromonas spp.* no seu cultivo. Transcorridos 15 dias de inoculação, também não foram observados crescimento de colônias do cultivo do rim dos peixes sobreviventes ao desafio. Houve crescimento de colônias bacterianas de gênero *Aeromonas*, a partir do cultivo feito do rim e lesões ulcerativas dos peixes mortos em função do desafio.

Diversos sinais clínicos também foram observados em função do desafio com *A. hydrophila*, sendo eles erosão de nadadeiras e perdas de escamas, lesões ulcerativas, principalmente nas proximidades do local de inoculação e músculo caudal, além de exoftalmia. Os sinais clínicos que também precederam a morte de animais infectados foram perda de equilíbrio, movimentos respiratórios lentos e ascite.

Características e rendimento de carcaça

O peso médio inicial dos alevinos utilizados no experimento foi estatisticamente semelhante ($P>0,05$) entre os tratamentos. Nas características corporais e rendimento de carcaça, os peixes alimentados com a dieta controle apresentaram menores médias em comparação aos demais tratamentos. O comprimento total, o comprimento padrão e o rendimento de carcaça com cabeça e consumo de ração (Tabela 2) não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$).

Em contrapartida, a altura, largura e rendimento de carcaça sem cabeça, apresentados na Figura 1, o tratamento referente ao óleo essencial de orégano foi estatisticamente superior ($P<0,05$) ao controle. O grupo que recebeu extrato etanólico de própolis não apresentou diferença significativa para estes parâmetros. A suplementação independente do aditivo melhorou significativamente ($P<0,05$) o fator de condição corporal (Figura 1), diferenciando apenas do controle.

Crescimento, conversão alimentar e eficiência alimentar

A suplementação com os aditivos afetou estatisticamente os parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos à ração contendo alimentos funcionais, desafiados com *A. hydrophila* apresentados na Figura 2. Uma melhora significativa ($P<0,05$) foi observada no peso final e no ganho de peso, nos tratamentos que recebeu o alimento funcional (T2 e T3), em comparação ao controle, não havendo diferença entre os tratados.

Diferença significativa ($P<0,05$) também foi observada na conversão alimentar aparente e na eficiência alimentar (Figura 2), entre o grupo que recebeu o OEO na ração e o grupo controle, apresentando o T3 melhores índices, o mesmo não ocorreu com o T2.

Sobrevivência, índice hepatossomático, lisozima e PCR-DGGE

A sobrevivência, o índice hepatossomático e lisozima sérica do sangue dos alevinos de tilápias do Nilo antes e após o desafio, submetidos à ração contendo aditivos naturais e

inoculação de *A. hydrophila* estão representados na Tabela 3. Para essas variáveis não foi encontrado diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$).

A curva de calibração de lisozima apresentou alta correlação linear ($r^2 = 0,978$) entre 50 e 300 ηg de lisozima por microlitro.

A Figura 3 refere-se ao perfil da microbiota intestinal das tilápias, alimentadas ou não com dietas contendo alimentos funcionais. A partir da análise de DGGE foi possível observar que o perfil do intestino dos animais tratados, apresentaram uma maior diversidade microbiana comparadas ao controle. Entre os grupos tratados o EEP foi o tratamento que demonstrou maior diversidade.

DISCUSSÃO

De acordo com as análises de qualidade físico-química da água dos aquários, os valores médios dos parâmetros de pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperaturas matutina e vespertina permaneceram dentro dos limites adequados para a espécie (KUBITZA, 2003).

Mediante aos resultados encontrados é possível constatar que, os grupos de alevinos que receberam os alimentos funcionais apresentaram respostas de desempenho superiores ao do grupo controle. Os animais quando suplementados com o EEP e OEO, obtiveram melhoras significativas do peso final, ganho de peso e fator de condição corporal comparados aos animais que não receberam o aditivo na dieta. Esse fato prova a vantagem do uso de alimentos funcionais inteiramente naturais, promovendo melhoras da utilização da ração, com respostas positivas ao desempenho, sem o risco de gerar problemas de contaminação ambiental e do produto final, além dos riscos de resistência bacteriana.

Algumas características e o rendimento de carcaça apresentaram melhores índices para o OEO (5 g/kg ração⁻¹) sendo este resultado corroborado pelas melhores taxas de crescimento,

conversão alimentar e eficiência alimentar comparados a dieta controle. Estudos tem demonstrado efeitos positivos do uso de OEO como aditivo alimentar, como Ferreira et al., (2014), mostraram em seu estudo que o OEO promove o crescimento de yellowtail tera (*A. altipaanae*), quando fornecidos em um nível de 0,5 g/kg, o que pode ter sido causado pelo aumento da digestibilidade e facilidade de absorção dos nutrientes. Zheng et al., (2009) verificaram que a adição de 0,05% do óleo de orégano em dietas fornecidas por oito semanas para catfish de 50g podem controlar a microflora intestinal melhorando assim o desempenho do animal.

Óleos essenciais como aditivos na alimentação animal, pouco foram estudados, principalmente para peixes. Em um estudo realizado com frangos de corte, foi possível verificar propriedades deste aditivo semelhantes aos encontrados na presente pesquisa relativos à promoção de crescimento (HONG et al., 2012). Já em ruminantes, não foi observado ganho peso quando alimentados com orégano seco (BAMPIDIS et al., 2005) ou com o próprio óleo, utilizado na alimentação de cordeiros (CANBOLAT E KARABULUT, 2010). Os autores indicam que mesmo sem efeitos visíveis do orégano este pode ser utilizado em rações, já que possui efeitos benéficos em nível celular (BAKKALI et al., 2008).

Acompanhado aos efeitos do OEO, o uso de 2,22 g de Extrato Etanólico de Propólis/kg de ração na presente pesquisa, mostrou-se eficiente para as taxas de desempenho das tilápias, o que corrobora com as taxas de crescimento observados por MEURER et al., (2009) para a mesma dose. Os valores de ganho de peso e conversão alimentar mostraram significativos, assim como no estudo de AZZA e ABD-EL-RHMAN (2009) quando usou propólis em seu experimento. Outros estudos mostraram que o uso entre 0,1 – 0,4 g de EEP/kg de ração na alimentação de truta atuam com promotores de crescimento (DENG et al., 2011), o fornecimento de 1% de EEP na ração para duas espécies de trutas por 50 semanas aumentou a velocidade de crescimento (VELOTTO et al., 2010). Em contrapartida

KASHKOOLI et al., (2011) não observaram variação no desempenho da truta arco-iris alimentadas com níveis crescentes de 0,5 a 9,0 g propolis/kg de ração durante nove semanas. Em codornas, DENLI et al., (2005) encontraram melhor ganho de peso com o fornecimento de própolis entre 0,5 a 1,5 g/kg a partir dos 15 dias de vida. A própolis contém certas vitaminas do complexo B e minerais essenciais que melhoram os cofatores digestivos e atividade enzimática. Estas propriedades podem contribuir para melhorar a digestão e absorção de nutrientes com um consequente aumento no peso dos peixes (AZZA e ABD-EL-RHMAN, 2009).

A mortalidade provocada por *Aeromonas spp.* em peixes são relacionadas principalmente com fatores predisponentes ambientais, tais como, lesões a pele, má qualidade de água, estresse térmico entre outros. Porém, quando as mesmas são isoladas a partir de peixes doentes, geralmente são mais virulentas, do que quando isolado a partir de água (PLUMB e HANSON, 2011), ocasionando os sinais clínicos severos como os observados neste experimento e reduzindo a taxa de sobrevivência. Não foram verificadas diferenças significativas relativas à sobrevivência, IHS e quanto aos valores de lisozima sérica em função do aditivo alimentar. Embora valores superiores destes parâmetros são vistos nos grupos tratados, assim como mudanças induzidas pelo aditivo alimentar sobre o microbioma intestinal, com destaques para o EEP, que também apresentaram uma maior diversidade microbiana na análise do PCR-DGGE. A composição de micro-organismos do intestino dos peixes, com uma maior diversidade taxonômica, pode influenciar na absorção de nutrientes pelo animal, afetando o crescimento e ganho de peso (BALCÁZAR et al., 2006 e MERRIFIELD et al., 2010), atuando positivamente para uma melhor imunidade, promovendo o bem-estar. Talvez um período de alimentação maior do que o ocorrido na referida pesquisa, esses efeitos imunológicos pudessem ser melhor evidenciados.

Segundo VIUDA-MARTOS (2008), a própolis é utilizada pela medicina desde os tempos antigos, devido às muitas propriedades biológicas que possui, como antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatórios e entre outros. Para comparar o efeito de um antibiótico de largo espectro (ocitetraciclina) com o da própolis, YONAR et al. (2011) concluíram que a própolis é indicada como imunoestimulante para trutas. O EEP derivado da própolis bruta possui as mesmas funções, sendo utilizado em pesquisas com desafios. Além de melhorar o desempenho em peixes, o uso de EEP ativa o sistema imune de tilápias e protege contra infecção como mostraram AZZA E ABD-EL-RHMAN, (2009) quando desafiaram os peixes contra *A. hydrophila*. Outros autores, realizando um experimento com carpas, verificaram que a elevada taxa de sobrevivência foi devido a resposta imunitária da própolis contra a *A. hydrophila* (CHU, 2006). Foi observado por ZHANG et al. (2009), que em *Myxocyprinus asiaticus* a combinação entre a própolis e extrato de *Herba epimedii* aumentou a resposta imune contra *Aeromonas spp.*. Apesar de ter afetado negativamente na dieta de aves AÇIKGÖZ E ALTAN (2005) indicaram a realização de mais pesquisas com desafios sanitários utilizando a propolis, corroborando com DENLI et al. (2005) que mostraram que é uma alternativa importante para a produção de as codornas. Usar EEP na alimentação de peixes necessita de mais estudos sobre a especificidade de cada tipo de própolis (RAMOS e MIRANDA, 2007), porém TALAS e GULHAN (2009) informam que o uso de EEP prolonga as funções fisiológicas dos peixes devido à presença dos flavonoides nele existentes.

Alguns autores mostram que o OEO tem potencial e é uma alternativa para uso, como aditivo natural, em substituição aos antibióticos utilizados em aves (HONG et al., 2012). Em organismos aquáticos, ARDÓ et al. (2008) encontraram resistência bactericida para tilápia do Nilo alimentadas com extrato de ervas chinesas. ZHENG et al. (2009), verificaram que a alimentação de bagres do canal feita com OEO, submetidos a um desafio com *A.*

hydrophila, aumentaram significativamente a atividade da lisozima e que as taxas de sobrevivência foram reforçadas.

CONCLUSÕES

Os dois aditivos naturais utilizados (extrato etanólico de própoli e óleo essencial de orégano) não se mostraram imunostimulantes frente a *Aeromonas hydrophila* porém, causaram efeito como promotores de crescimento e sobre a diversidade microbiana intestinal.

REFERÊNCIAS

- AÇIKGÖZ, Z.; YÜCEL, B.; ALTAN, Ö. The effects of propolis supplementation on broiler performance and feed digestibility. **Achiv fur Geflügelk** v. 69, p. 117-122, 2005.
- AMARANTE, F. A. composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de mastite bovina. Petrolina, PE: UNIVASF, 2011. p. 54 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2011.
- ARDÓ, L. et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.275, p. 26–33, 2008.
- AZZA, M. M.; ABD-EL-RHMAN. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.27, n.3, p.454-459, 2009.
- BAKKALI, F. et al., Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 446–475, 2008.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. Microbiol.** 114, 173–186, 2006.

- BAMPIDIS V. A.; CHRISTODOULOU V.; FLOROU-PANERI P.; CHRISTAKI E.; CHATZOPOULOU P. S.; TSILIGIANNI, T.; SPAIS A. B. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. **Br. Poult. Sci.** v. 46, p. 595-601, 2005.
- CANBOLAT, Ö.; KARABULUT, A. Effect of urea and oregano oil supplementation on growth performance and carcass characteristics of lamb fed diets containing different amounts of energy and protein. **J. Vet. Anim. Sci.** v. 34(2), p. 119-128, 2010.
- BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm**, v.22(3), p.318-22, 2009.
- BUSATTA, C.; MOSSI, A.J.; RODRIGUES, M.R.A.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology** v.38, n.4, p. 610-616, 2007.
- CASCON, A.; YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; SÁNCHEZ, M.; HERNANZ, C.; LUENGO, J. M.; NAHARRO, G. A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3233–3241, 2000.
- CHATZOPOULOU, P. S.; TSILIGIANNI, T.; SPAIS, A. B. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. **Br. Poult. Sci.**, v. 46, p. 595–601, 2005.
- CHU, W. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 21, p. 113-117, 2006.
- CITARASU, T. **Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry**. *Aquacult. Int.* 18, 403–414, 2010.
- COSTA, A.B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. Piracicaba, SP: USP, 2003. 54p. Tese (Doutorado em

Agronomia – Área de Concentração Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, 2003.

COSTA, M.M.; OLIVEIRA, S.T.L; BALEN, R.E.; BUENO JUNIOR, G.; BALDAN, L.T.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D. Brown seaweed meal to Nile tilapia fingerlings. **Archivos de zootecnia**, vol. 62, n. 237, p. 101-109, 2013.

DENG, J.; AN, Q.; BI, B.; WANG, Q.; KONG, L.; TAO, L.; ZHANG, X. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol Biochem.** v. 37, p. 959-967, 2011.

DENLI, M.; CANKAYA, S., SILICI, S.; OKAN, F.; ULUOCAK, A. N. Effect of Dietary Addition of Turkish Propolis on the Growth Performance, Carcass Characteristics and Serum Variables of Quail (*Coturnix coturnix japonica*). **J. Anim. Sci. Asian-Aust.** v.18, p. 848-854, 2005.

EKREN, S.; YERLIKAYA, O.; TOKUL, H.E.; AKPINAR, A.; AÇU, M. Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. **African Journal of Microbiology Research.** v. 7, n. 5), p. 383-388, 2013.

ELLIS, A.E. Lysozyme assay. In: Stolen JS, Fletcher DP, Anderson BS, Robertson BS, editors. **Techniques in fish immunology.** Fair Haven, NJ: SOS Publication; p. 101-3, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura.** Roma: Subdivisión de Políticas y Apoyo en Materia de Publicación Electrónica. Rome. p.193, 2010.

FERREIRA, P. M. F.; NASCIMENTO, L. S.; DIAS, D. C.; MOREIRA, D. M. V.; SALARO, A. L.; FREITAS, M. B. D. Essential oregano oil as a growth promoter for the *Yellowtail tetra*, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the world aquaculture society.** v. 45, n. 1, 2014.

FRACALOSSI, D. M. & CYRINO, J. E. P. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 368, 2012.

GHATAK, S.; AGARWAL, R.K.; BHILEGAONKAR, K.N. Species identification of clinically important *Aeromonas spp.* by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.550-554, 2007.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, I. B. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 267, 2010.

HONG, J-C.; STEINER, T.; AUFY, A.; LIEN, T-F. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. **Livestock Science**, v.144, p. 253–262, 2012.

KASHKOOLI, O.B. DORCHEH, E. E.; MAHBOOBI-SOOFIANI, N.; SAMIE, A. Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental**, v.74, p 315–318, 2011.

KUBITZA, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundáí, SP – Brasil, v.1, p. 229, 2003.

MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture** 302, 1–18, 2010.

MEURER, F.; COSTA, M.M.; BARROS, D.A.D.; OLIVEIRA, S.T.L.; PAIXÃO, P.S. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. **Aquaculture Research**. 40, 603-608, 2009.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. [2010]. Produção de pescado aumenta 25%. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-Pescado-aumenta>. Acesso em: 25 set. 2011.

OBACH, A.; QUENTEL, C.; BANDIN, L.F. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Dis Aquat Org**, v.15, p. 175-85, 1993.

PLUMB, J. A.; HANSON, L. A. **Health Maintenance and Principal Microbial Diseases, of Cultured Fishes**, Blackwell Publishing Ltd, USA, ed. 3^a, p. 492, 2011.

PUROHIT, M.K.; SINGH, S.P.; Assessment of various methods for extraction of metagenomics DNA from saline habits of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity. In: **Letters in Applied Microbiology**, 49, p.338-344, 2009.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Medicine**. London, Mosby-Year ed. p. 648, 1994.

RAMOS A. F. N.; MIRANDA J. L. Propolis: a review of its anti-inflamamtory and healing actions. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 13, p. 697-710, 2007.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais**. Editora UFV, Viçosa, 2000. p.141.

SANTOS, P.G.; SANTOS, P. A.; BELLO, A. R.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. **Applied Microbiology**, n. 52, p. 49-55, 2010.

TALAS, Z.S.; GULHAN, M.F. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental**, v.72, p. 1994–1998, 2009.

TSADIK, G.G.; BART, A.N. Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 272, p. 380–388, 2007.

VELOTTO, S.; VITALE, C.; VARRICCHIO, E.; CRASTO, A. Effect of Propolis on the Fish Muscular Development and Histomorphometrical Characteristics. **ACTA VET. BRNO**, v.79, p. 543-550, 2010.

VIANA, P. V. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium*. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências e Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 95, 2013.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ J.A. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal Of Food Science**, v. 73, 2008.

YONAR, M. E.; YONAR, S. M.; SILICI, S. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 318-325, 2011.

ZHANG, G.; GONG, S.; YU, D.; YUAN, H. Propolis and Herba Epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 26, p. 467–472, 2009.

ZHENG, Z.; YINGENG, W.; QINGYIN, W.; NANNAN, D.; MEIJIE, L.; JIANGBO, Q.; BIN, L.; LAN, W. Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 32, p. 391 e 395, 2012.

Tabela 1. Composição das rações experimentais

Ingredientes¹	Alimentos funcionais Kg ração⁻¹		
	Controle	2.22 g EEP	0,5 % OEO
Farelo de soja	70,79	70,79	70,79
Milho	16,70	16,70	16,70
Óleo de soja	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicálcico	2,80	2,80	2,80
Calcário calcítico	0,20	0,20	0,20
Extrato etanólico de própolis (g kg ração ⁻¹)	0,00	2,22	0,00
Óleo essencial de orégano (%)	0,00	0,00	0,5
Suplemento mineral e vitamínico ²	4,00	4,00	4,00
Sal	0,50	0,50	0,50
Butilhidroxitolueno (BHT)	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00

¹ De acordo com ROSTAGNO et al. (2000); ² Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ác. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg.

Tabela 2. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos às rações contendo aditivos naturais.

Parâmetros	Tratamentos ³			P*
	1	2	3	
Peso inicial (g)	7,72±0,09	7,65±0,09	7,65±0,07	0,22
Comprimento total (cm)	10,68±0,32	10,87±0,34	11,03±0,38	0,19
Comprimento padrão (cm)	8,53±0,27	8,71±0,27	8,81±0,24	0,16
RCC ¹	13,81±1,26	15,19±1,70	16,04±1,79	0,05
Consumo de ração (g)	22,50±2,22	24,38±0,89	23,23±2,43	0,22

¹Rendimento de carcaça com cabeça; *P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração⁻¹ inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

Tabela 3. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossômico (IHS) e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo aditivos naturais.

Parâmetros	Tratamentos ¹			P*
	1	2	3	
Sobrevivência (%)	35,71±19,67	53,57±30,37	46,43±22,50	0,41
IHS	1,86±0,48	1,75±0,24	1,84±0,23	0,82
Lisozima antes (µg/mL)	1,02±0,34	1,55±0,62	1,29±0,63	0,22
Lisozima pós (µg/mL)	0,83±0,56	1,45±0,59	1,10±0,58	0,16

*P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração⁻¹ inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*.

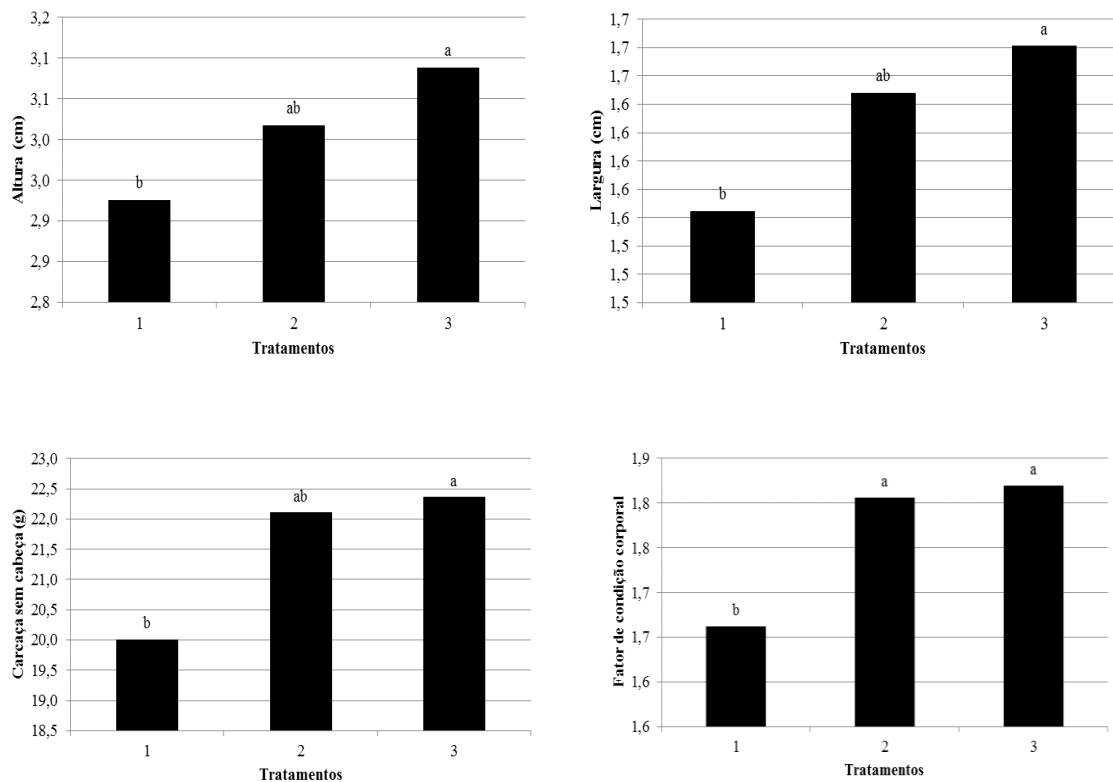


Figura 1. Características e rendimento de carcaça das tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo aditivos naturais: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração⁻¹ inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

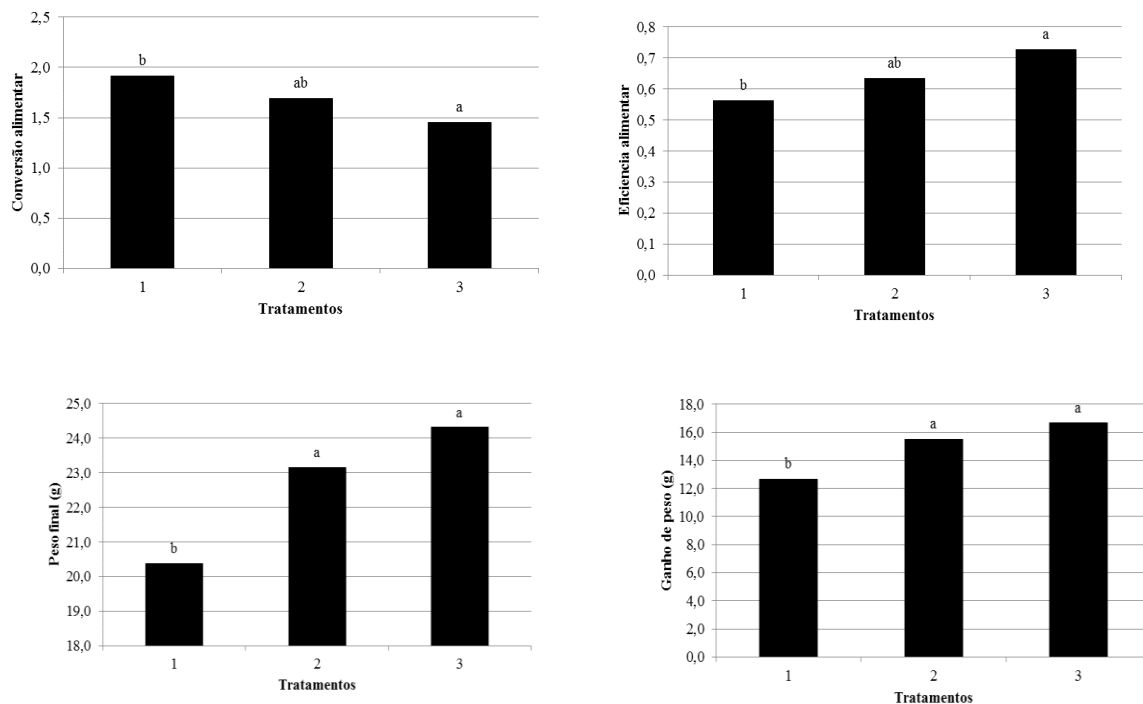


Figura 2. Parâmetros de desempenho dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos às rações contendo aditivos naturais: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração⁻¹ inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

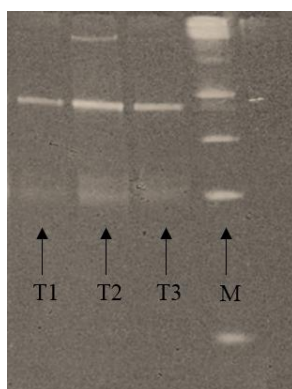


Figura 3. Análise de PCR-DGGE do intestino dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos às rações contendo aditivos naturais: (T1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (T2) grupo recebendo ração contendo 2,22 g de EEP kg ração⁻¹ inoculados com *A. hydrophila*; (T3) grupo recebendo ração contendo 0,5% de OEO inoculados com *A. hydrophila*

Artigo a ser Traduzido e Submetido para Aquaculture Research**Dieta com *Ascophyllum nodosum* e *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito após a inoculação de *Aeromonas hydrophila*****RESUMO**

Este estudo investigou os efeitos individuais e combinados do suplemento pré e probióticos sobre o crescimento, carcaça e sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo, contra infecção por *Aeromonas hydrophila*. Durante o tempo experimental, que antecedeu o desafio, os peixes estavam saudáveis e não ocorreu mortalidade. Iniciaram com peso médio de $6,54 \pm 1,16$ g, foram distribuídos em aquários contendo 60 L de volume útil, mantidos a aeração constante. Quatro dietas foram confeccionadas, para compor os tratamentos: dieta contendo 0 (controle), 20 g. kg ração⁻¹ da farinha da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (prebiótico) (FAM); 6×10^8 UFC. Kg ração⁻¹ da *S. cerevisiae* (probiótico); 20 g. Kg ração⁻¹ da farinha da alga marinha *A. nodosum* + 6×10^8 UFC. Kg ração⁻¹ do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* (simbiótico). Os alevinos foram alimentados por um período de 45 dias. Após trinta dias experimentais, os peixes foram desafiados com *A. hydrophila*, e as mortalidades foram registradas durante 15 dias pós-infecção. Os resultados mostraram que a administração dos aditivos de forma isolada, não apresentaram efeito significativo, em contrapartida, a dieta simbiótica apresentou melhora significativa ($P < 0,05$) sobre a conversão alimentar aparente; a sobrevivência foi superior após o desafio com *A. hydrophila*, em comparação à dieta controle. Apresentaram também um crescimento de levedura a partir do cultivo do intestino, superior aos demais tratamentos. Estes resultados mostraram que a suplementação dietética de 6×10^8 UFC. Kg ração⁻¹ *S. cerevisiae* em conjunto com 20 g. Kg ração⁻¹ da FAM, apresentou melhoria no crescimento, vantagens na saúde e colonização do microbioma intestinal. A forma simbiótica testada, demonstrou efeito imunoestimulante e de promotor de crescimento para a tilápia do Nilo.

Palavras chave: piscicultura, prebiótico, probiótico, simbiótico, microbiologia de peixe

ABSTRACT

This study investigated the individual and combined effects of pre- and probiotics supplement on growth, carcass and survival of juvenile Nile tilapia, against infection by *Aeromonas hydrophila*. During the experimental period, leading up to the challenge, the fish were healthy and there was no mortality. They started with an average weight of 6.54 ± 1.16 g, were distributed in aquariums containing 60 L working volume, kept constant aeration. Four diets were made to compose treatments: diet containing 0 (control), 20 g. kg feed⁻¹ flour of seaweed *Ascophyllum nodosum* (prebiotic) (FAM); 6×10^8 UFC. Kg feed⁻¹ of *Saccharomyces cerevisiae* (a probiotic); 20 g. Kg feed⁻¹ of kelp meal *A. nodosum* + 6×10^8 UFC. Kg feed⁻¹ probiotic *Saccharomyces cerevisiae* (symbiotic). The fry were fed for a period of 45 days. After thirty days of experimental period, the fish were challenged with *A. hydrophila*, and mortalities were recorded for 15 days post-infection. The results showed that the administration of isolation additives, no significant effect, however, the symbiotic diet showed significant improvement ($P < 0.05$) on feed conversion; survival was higher after the challenge with *A. hydrophila*, compared to the control diet. They also presented a yeast growth from the gut cultivation, higher than the other treatments. These results show that dietary supplementation of 6×10^8 CFU. Kg⁻¹ feed *S. cerevisiae* together with 20 g. Kg feed⁻¹ FAM, showed improvement in growth, benefits in health and colonization of the intestinal microbiome. The tested symbiotically demonstrated immunostimulatory effect and growth promoter for Nile tilapia.

Keywords: fish, prebiotic, probiotic, symbiotic, fish microbiology

1. Introdução

O Vale do São Francisco possui uma grande tradição na pesca e na produção de peixes. Esta atividade é realizada tanto em criatórios associados a modernas tecnologias de produção, como por pequenos produtores rurais e famílias de pescadores. A otimização dos lucros e, conseqüentemente, o sucesso desta atividade econômica depende da adequada utilização dos recursos disponíveis e do controle de fatores que afetam negativamente o desenvolvimento dos animais.

As tilápias são importantes contribuintes, como espécie utilizada na produção piscícola na região. Os esforços de investigações em peixes têm se concentrado em otimizar a produção com alternativas ecológicas em substituição ao uso terapêutico de antimicrobianos. Espécies

de *Aeromonas* spp. que são patógenos de grande importância na piscicultura, foram isoladas de peixes e apresentaram-se resistentes às drogas antimicrobianas, mesmo sem o uso de tais substâncias para o controle de enfermidades infecciosas (HIRSCH et al., 2006). Os riscos do surgimento de enfermidades estão relacionados ao aumento das densidades de estocagem dos animais e dos manejos aos quais são submetidos (MEIRELLES, 2010). Probióticos, prebióticos e simbióticos oferecem possibilidades potenciais, proporcionando benefícios para o animal principalmente por meio da modulação direta ou indireta, da microbiota intestinal (MERRIFIELD et al., 2010).

A partir de 1995 com os estudos de Mustafa et al. (1995) e Nacagawa et al. (1997), foram resumidos os benefícios do uso de algas marinhas como componente de rações na aquicultura. Desde então, diversos estudos têm demonstrado a importância dessas algas (DAVIES et al., 1997; WASSELF et al., 2001; CASAS-VELDEZ et al., 2006; PHAM et al., 2006; VALENTE et al., 2006; SOLER-VILA et al., 2009). Uma das funções reconhecidas é a sua capacidade em retardar a absorção de nutrientes alimentares e melhorar a utilização de carboidratos e proteínas nas dietas (MUSTAFA et al., 1995). Ainda, segundo relatos de Fike et al. (2005), a *Ascophyllum nodosum* possui uma biodisponibilidade de microminerais, vitaminas, antioxidantes, bem como outros metabólitos que podem ser fatores que contribuem na melhora do desempenho do animal.

Nos estudos têm-se enfatizado a capacidade dos probióticos para estimular o apetite, melhorar a absorção de nutrientes, e fortalecer o sistema imune do hospedeiro (CHIU et al., 2010; WANG et al., 2008; IRIANTO e AUSTIN, 2002). Dietas enriquecidas com probióticos *Saccharomyces cerevisiae* têm mostrado papel gratificante como promotor de crescimento e imunostimulante em peixes e, o seu uso vem sendo recomendado na aquicultura (EL-BOSHY et al., 2010; HE et al., 2009). Os mecanismos de defesa não-específicos são considerados os mais importantes contra patógenos de origem microbiana em piscicultura (CHIU et al., 2010, CRUZ et al., 2012). Estimular o sistema imunológico por meio de alimentação é salutar ao benefício no cultivo comercial.

Os simbióticos, aplicação combinada de probióticos e prebióticos (SCHREZENMEIR e VRESE, 2001), visam proporcionar vantagem competitiva ao probiótico, atuando eficazmente na melhora da sobrevivência e implantação do aditivo alimentar microbiano no trato gastrointestinal do hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Melhorias no desempenho em peixes alimentados com uma dieta simbiótica pode ser atribuído a um status elevado de saúde, um aumento da digestibilidade da dieta prébiótica, ou a melhora da sobrevivência e da colonização (RODRIGUEZ-ESTRADA et al., 2009; AI et al., 2011; YE et

al., 2011; GENG et al., 2011; MEHRABI et al., 2012; CEREZUELA et al., 2012) em comparação com as dietas de pré e probióticos separadas.

Esses estudos são importantes, pois, a partir dos resultados encontrados, servem como base para aplicação em nível industrial. Nessas condições, a presente pesquisa foi realizada para avaliar o efeito potencial da administração dietética da alga marinha *A. nodosum* e da levedura *S. cerevisiae*, separadamente e combinados, para alevinos de tilápia do Nilo, sobre os parâmetros de desempenho e carcaça, microbiota intestinal e resistência ao desafio com *Aeromonas hydrophila*.

2. Material e Métodos

Local de execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus Ciências Agrárias, localizado na Fazenda experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, situada na Rodovia BR 407, km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº “C1”, Petrolina-PE.

O experimento foi conduzido conforme protocolo nº 0006/160812, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco - CEUA/UNIVASF.

Isolados bacterianos

O isolado de *A. hydrophila* foi obtido a partir do peixe pacamã (*Lophosilurus alexandri*), provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura (CIRPA) de Bebedouro/PE. Este isolado foi previamente identificado por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994) e, por meio da PCR para confirmação de gênero e espécie, segundo metodologia descrita por Ghatak et al. (2007). Fatores de virulência também foi caracterizado, sendo positivo para os genes Lipase (SEN, 2005), Elastase (CASCÓN et al., 2000) e o gene Fla (SANTOS et al., 2010).

Condições experimentais

No intuito de testar os aditivos alimentares foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo, provenientes do CIRPA de Petrolina-PE. Cento e vinte alevinos, aparentemente

saudáveis, com peso médio de $6,54 \pm 1,15$ g foram distribuídos em 20 aquários contendo 60 L de volume útil. Os peixes foram adaptados e mantidos em água tratada desclorada. Sendo considerado uma unidade experimental, um aquário contendo seis peixes.

Os aquários possuíam aeração constante, por meio de compressores de ar, interligados por mangueiras e pedras micro-porosas. Havia troca da água dos aquários diariamente em 50% no período da manhã e à tarde. Para a conservação da qualidade da água foram feitas limpezas internas nas paredes dos aquários e assim evitar o desenvolvimento de perifítons.

Os tratamentos testados foram: dieta base (tratamento 1); dieta base + 20 g. Kg ração⁻¹ da farinha da alga marinha *A. nodosum* (tratamento 2); dieta base + 6×10^8 UFC. Kg ração⁻¹ do probiótico *S. cerevisiae* (tratamento 3); dieta base + 20 g. Kg ração⁻¹ da farinha da alga marinha *A. nodosum* + 6×10^8 UFC. Kg ração⁻¹ do probiótico *S. cerevisiae* (simbiótico) (tratamento 4). Desafiados com *A. hydrophila*. O experimento teve a duração de 45 dias.

Rações

Foram formuladas rações contendo 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível. Kg de ração⁻¹ (Tabela 1), composição e percentual das dietas de acordo com COSTA et al. (2013) . Para a fabricação das rações os alimentos foram moídos em peneira de 1 mm, posteriormente, foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica, e estes peletes secos em estufa de ventilação forçada por 24 horas a 35° C. Quando secas, foram quebrados e assim, adequado o tamanho do pelete à boca dos alevinos e armazenadas em freezer a -20° C.

O arraçoamento foi feito três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 16h00, em um nível de 8% do peso vivo dos alevinos. Semanalmente, as unidades experimentais eram pesadas para a adequação da quantidade de ração fornecida.

Ascophyllum nodosum

Ascophyllum nodosum, alga comumente encontrado nas águas costeiras do norte do Oceano Atlântico (BRANDEN et al., 2007) é utilizada para a fabricação de produtos agropecuários (FLEURENCE, 1999). A FAM apresenta-se como um pó fino, de coloração creme clara (OLIVEIRA et al., 2014). A quantidade fornecida como prebiótico foi baseada em Costa et al. (2013). Os valores bromatológicos da FAM, fornecidos pelo fabricante, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Composição das rações experimentais³

Ingredientes ¹	Tratamentos			
	1	2	3	4
Farelo de soja	70,79	70,79	70,79	70,79
Milho	16,70	16,70	16,70	16,70
Óleo de soja	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicálcico	2,80	2,80	2,80	2,80
Calcário calcítico	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>A. nodosum</i> g.kg ⁻¹	0,00	20	0,00	20
<i>S. cerevisiae</i> g.kg ⁻¹	0,00	0,00	6,0	6,0
Suplemento mineral e vitamínico ²	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,50	0,50	0,50	0,50
Butil hidroxi tolueno (BHT)	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ De acordo com Rostagno et al. (2000); ² Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ác. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg. ³Costa et al. (2013).

Tabela 2. Composição bromatológica da farinha da alga marinha marrom (*A. nodosum*) informada pelo fabricante¹

Aminoácidos	(%)	Vitaminas	ppm	Minerais	ppm
Alanina	0,34	Biotina	0,1 - 0,3	Boro	80 - 100
Arginina	0,22	Caroteno	30 - 60	Cromo	1 - 2
Aspartato	0,53	Ácido Fólico	0,1 - 0,5	Cobalto	< 1
Cistina	0,07	Niacina	10 - 30	Cobre	1 - 10
Glutamato	0,71	Riboflavina	5 - 10	Iodo	< 1.000
Glicina	0,30	Tiamina	1 - 5	Ferro	100 - 500
Histidina	0,07	Tocoferóis	15 - 300	Manganês	10 - 50
Isoleucina	0,26	Minerais	(%)	Selênio	3 - 4
Leucina	0,38	Fósforo	0,1 - 0,2	Estrôncio	100 - 600
Lisina	0,30	Cálcio	1,0 - 2,0	Vanádio	1 - 5
Metionina	0,11	Cloro	2,0 - 3,0	Zinco	10 - 50
Fenilalanina	0,24	Sódio	2,5 - 3,5	Molibidênio	< 2
Prolina	0,25	Potássio	1,5 - 2,5	Chumbo	< 1
Serina	0,27	Magnésio	0,5 - 1,0	Cádmio	< 1
Treonina	0,25	Enxofre	2,0 - 3,0	Carboidratos	(%)
Tirosina	0,12	Minerais	ppm	Alginato	18,0 - 27,0
Triptofano	0,06	Alumínio	50 - 150	Manitol	3,0 - 8,0
Valina	0,27	Bário	5 - 15	Laminarina	2,0 - 5,0

¹ Acadian Seaplants Limited.

Saccharomyces cerevisiae

Um aditivo probiótico YEA-SACCTM 1026 (Alltech), de uso exclusivo para a alimentação animal, foi utilizado no presente experimento. Um pó de coloração marrom de odor agradável, de constituição básica *S. cerevisiae* cepa 1026 (mín.) 1×10^8 UFC/g. No preparo da ração, *S. cerevisiae* foi previamente diluído em água, posteriormente misturado à fração do milho e então incorporado aos demais ingredientes.

A partir das rações devidamente fabricadas, foram feitos cultivos para confirmação de células probióticas viáveis, nas rações. Um grama de cada ração triturada foi diluído em 10 mL de solução salina estéril (0,5%). Em triplicata, usando o meio YGC (yeast growth chloramphenicol), foi cultivado o inóculo, então incubados por 48 horas em estufa a 38° C. Após o cultivo efetuou-se a contagem, juntamente com sua identificação morfológica e tintoriais, conforme Quinn et al. (1994).

Teste de desafio

Os peixes foram desafiados, após quatro semanas experimentais, por via intramuscular latero-dorsal direita, com um preparado de inóculo bacteriano de *A. hydrophila*, com diluição em solução salina estéril na concentração de 10^7 UFC/mL (0,2 mL animal⁻¹), padronizada em espectrofotometria. Após a inoculação os animais foram mantidos em observação por 15 dias. Os peixes mortos foram utilizados para re-isolamento bacteriano.

Mensurações e análises experimentais

Os parâmetros físico químicos da água, foram aferidos diariamente, quanto a temperatura, condutividade elétrica e pH da água dos aquários experimentais (medidor multiparâmetros modelo HI 9828, HANNA Instruments).

Dia antecedente ao desafio, foi feito um cultivo da água dos aquários em meio TSA, a fim de verificar a qualidade microbiológica quanto à presença de *A. hydrophila* no ambiente.

Ao final do período experimental, depois de anestesiados com benzocáína (100mg/L) e eutanasiados por secção medular, os peixes de cada unidade experimental foram pesados e medidos para a determinação dos parâmetros de desempenho e carcaça. Dois peixes de cada unidade experimental tiveram o seu fígado extraído para a determinação do índice hepatossômico (IHS), [(peso do fígado/ peso corporal)x100] e de um deles foi feito cultivo bacteriano do intestino em meio YGC. Além disso, fragmentos de tecido hepático e intestinal foram enviados para processamento e análise histológica, conforme descrito abaixo.

Atividade da lisozima

A análise do parâmetro imune não específico da atividade da lisozima dos animais sobreviventes foi realizada de acordo com metodologia descrita por Ellis (1990) e Obach *et al.* (1993), com pequenas modificações. Esta análise foi realizada com alevinos antes e após o desafio sanitário. Para tal, o sangue foi centrifugado (2.000 g/15 min) e o soro obtido foi mantido a -20°C. O nível de lisozima foi medido por ensaio turbidimétrico, utilizando lisozima liofilizada (2mg/mL) de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich/L4631) como padrão. Para determinação da curva de calibração foram adicionadas diferentes concentrações de solução de lisozima diluída 1.000X até a obtenção das concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng e o volume completado para 150µl com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), sendo também adicionado 150µl da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2mg/ml), em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), totalizando um volume final de 300µl. Como controle foi utilizado o tampão fosfato (300µl). A redução da densidade óptica (OD) em 620nm foi avaliada entre o tempo zero e 6 minutos a 26°C e a curva de calibração para lisozima foi obtida considerando os valores da redução da OD para cada concentração versus a concentração de lisozima em um volume final de 300µl.

Posteriormente, as amostras de soro foram aquecidas (banho-maria a 56°C por 30 minutos) para inativar as proteínas do sistema complemento e para certificar que a lise do *M. lysodeikticus* foi ocasionada exclusivamente por ação da lisozima. Em microplacas de ELISA, foram adicionados 10 µL de soro, 140 µL de tampão fosfato de sódio e 150 µL de suspensão *M. lysodeikticus* (0,2 mg/mL) para completar 300 µL de volume final. Logo após, a absorbância foi medida em leitora de placa de ELISA Easys® e mensurada em filtro de 620 nm no tempo zero, e então foram incubadas durante seis minutos em estufa à 26°C. Uma amostra em branco foi preparada utilizando tampão de fosfato de sódio (300 µL). Diferença entre a turbidez inicial e final (densidade óptica (OD) de redução) foi medida entre o tempo zero e seis minutos, a 620 nm. Os resultados foram expressos usando os valores de redução de OD para cada volume da amostra (300µl). A equação de regressão linear da curva de calibração de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima no soro (µg/mL) dos peixes.

Análise estatística

Depois de avaliados todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, lisozima, IHS, sobrevivência, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos análise de variância, (One-way ANOVA). O pressuposto de

homogeneidade foi verificado pelo teste Levene. Caso verificado diferença significativa ($p < 0,05$) realizou-se o teste Tukey para variâncias homogêneas. Utilizou-se o *software* Statistica 5.0 para todas as análises.

3. Resultados

Água dos aquários e cultivo bacteriano

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram $27,51 \pm 0,04^\circ \text{C}$ e $28,00 \pm 0,53^\circ \text{C}$; $6,89 \pm 0,07$ e $6,64 \pm 0,05$; $6,10 \pm 0,13$ e $6,42 \pm 0,05 \text{ mg/L}$; $79,0 \pm 0,02$ e $83,0 \pm 0,02 \mu\text{Sm/cm}$, respectivamente. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos.

A partir do cultivo da água dos aquários em meio TSA, não houve crescimento significativo de bactérias e, não houve a presença de *Aeromonas* spp., confirmando assim sua salubridade. Do cultivo do rim e lesões ulcerativas dos peixes mortos em função do desafio, houve crescimento de colônias bacterianas de gênero *Aeromonas*. No final do período experimental, o cultivo do rim dos demais peixes, foi realizado e não foram observados crescimento de colônias significativas.

A alterações clínicas dos peixes desafiado com *A. hydrophila* constituiu de perda de equilíbrio e movimentos respiratórios lentos e ascite, além de ocorrência de mortalidade. Patologias externas foram também evidenciada corresponderam a lesões ulcerativas, principalmente nas proximidades do local de inoculação que prorrogaram até a nadadeira caudal, com erosão e perdas de escamas, além de casos de exoftalmia.

A partir do cultivo realizado do intestino dos peixes alimentados ou não com dieta contendo aditivos alimentares, foram obtidos as seguintes médias de crescimento: 0; 600; 375; $1.287,5 \text{ UFC. g intestino}^{-1}$, para o tratamento 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

Crescimento, conversão alimentar, eficiência alimentar e fator de condição corporal

Os parâmetros de crescimento dos alevinos de tilápia, desafiados com *A. hydrophila* estão apresentados na Tabela 3. As médias de peso inicial, peso final e ganho de peso, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). O mesmo comportamento ocorreu para o fator de condição corporal (FCC) e a eficiência alimentar (EA) ($P > 0,05$).

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente, eficiência alimentar e fator de condição corporal dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração contendo aditivos alimentares.

Parâmetros	Tratamentos ¹				P*
	1	2	3	4	
Peso inicial (g)	6,55±0,08	6,50±0,08	6,56±0,09	6,53±0,10	0,76
Peso final (g)	21,26±3,58	24,55±2,22	23,01±1,73	23,53±1,99	0,25
Ganho de peso (g)	14,71±3,63	18,04±2,20	16,45±1,81	17,00±2,01	0,25
CAA	1,70±0,45 ^b	1,29±0,12 ^{ab}	1,49±0,05 ^{ab}	1,23±0,12 ^a	0,04
EA	0,68±0,13	0,80±0,06	0,76±0,05	0,84±0,08	0,07
FCC	1,71±0,07	1,88±0,07	1,87±0,15	2,09±0,54	0,26

*P = P-valor; ¹ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com *A. hydrophila*

Em contrapartida, a conversão alimentar aparente (CAA), apresentado na Figura 1 referente aos animais alimentados com simbiótico, apresentou uma melhora significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle, não apresentando diferença, não diferindo dos animais tratados com prebiótico e probiótico.

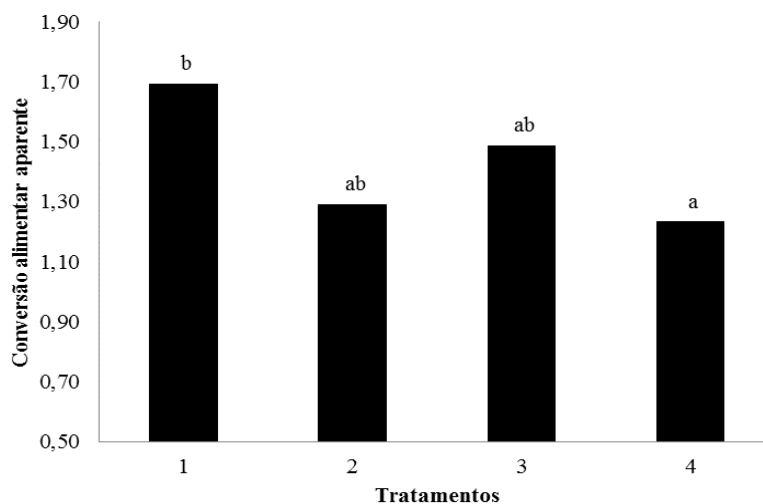


Figura 1. Conversão alimentar aparente dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo aditivos alimentares: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com *A. hydrophila*

Características e rendimento de carcaça

Os valores médios de comprimento total, comprimento padrão, largura, altura, rendimento de carcaça com e sem cabeça e o consumo total de ração dos alevinos alimentados com diferentes aditivos, encontram-se na Tabela 4. Estes parâmetros não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) em função dos tratamentos.

Tabela 4. Valores médios de características e rendimento de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo submetidos a alimentos funcionais.

Parâmetros	Tratamentos ³				P*
	1	2	3	4	
Comprimento total (cm)	10,70±0,56	10,95±0,25	10,74±0,49	10,61±0,73	0,78
Comprimento padrão (cm)	8,63±0,50	8,94±0,20	8,65±0,38	8,55±0,51	0,49
Altura (cm)	2,97±0,15	3,13±0,10	3,02±0,20	3,03±0,20	0,51
Largura (cm)	1,52±0,08	1,56±0,03	1,59±0,11	1,60±0,08	0,32
RCC ¹	21,74±3,28	23,21±1,57	23,69±3,75	24,38±1,22	0,48
RC ²	15,04±2,37	16,62±0,90	16,88±3,45	16,89±0,82	0,50
Consumo de ração (g)	21,65±1,74	22,51±1,44	21,55±1,43	20,42±2,45	0,37

*P = P-valor; ¹Rendimento de carcaça com cabeça; ²Rendimento de carcaça sem cabeça; ³ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com *A. hydrophila*

Sobrevivência, índice hepatossomático e lisozima

Parâmetros imunes dos alevinos frente ao desafio com *A. hydrophila* são apresentados na Tabela 5. Para a lisozima sérica antes do desafio e após o desafio sanitário não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$). Para o índice hepatossomático (IHS) também presente na Tabela 5, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 5. Valores médios de sobrevivência, índice hepatossomático e lisozima dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a ração aditivos alimentares.

Parâmetros	Tratamentos ³				P*
	1	2	3	4	
Sobrevivência (%)	30,00±11,18 ^b	35,00±13,69 ^{ab}	35,00±13,69 ^{ab}	60,00±22,36 ^a	0,03
IHS	1,74±0,27	1,39±0,15	1,52±0,23	1,54±0,30	0,17
Lisozima 1 (µg/mL) ¹	1,52±0,83	1,64±0,52	1,90±0,69	1,02±0,38	0,20
Lisozima 2 (µg/mL) ²	1,59±0,26	2,56±1,17	1,64±0,48	1,31±0,39	0,05

¹ Lisozima antes do desafio; ² Lisozima após o desafio; *P = P-valor; ³ (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com *A. hydrophila*

A percentagem de sobrevivência após o desafio com *A. hydrophila* (Tabela 4) foi maior no tratamento com o aditivo simbiótico (T4), comparado ao controle (P<0,05), não apresentando diferença significativa entre o tratamento da *A. nodosum* e *S. cerevisiae*. Todas as unidades experimentais durante o período antecedente ao desafio sanitário permaneceram com 100% de sobrevivência.

A curva de calibração de lisozima apresentou alta correlação linear ($r^2 = 0,978$) entre 50 e 300 ng de lisozima por microlitro.

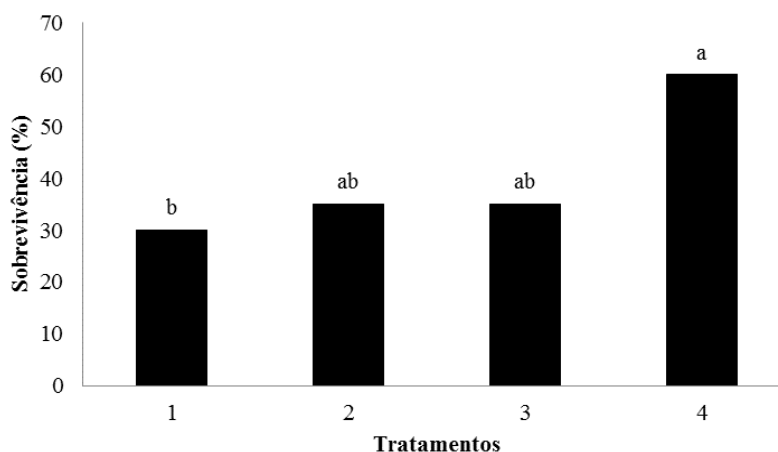


Figura 2. Sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo diferentes aditivos alimentares: (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (2) grupo recebendo ração contendo prebiótico inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo probiótico inoculados com *A. hydrophila*; (4) grupo recebendo ração contendo simbiótico inoculados com *A. hydrophila*

4. Discussão

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários, pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperaturas matutina e vespertina permaneceram dentro dos limites adequados para a espécie (KUBITZA, 2003).

Foram investigados na presente pesquisa, os efeitos da administração do probiótico *S. cerevisiae* e da farinha da alga marinha *A. nodosum* isolados e em combinação. Respostas benéficas ao uso da *A. nodosum*, já vem sendo propostas (OLIVEIRA et al., 2014; COSTA et al., 2013; NAKAGAWA et al., 1997; GABRIELSEN e AUSTRENG, 1998); assim como para a *S. cerevisiae* (LARA-FLORES et al., 2003; ABDEL-TAWWAB et al., 2008; WACHÉ et al., 2006). Tampouco são os estudos a despeito do uso de aditivos alimentares combinados para peixes. Embora a partir dos resultados encontrados, nos levam a crer no potencial efeito dessa união.

Mediante as análises dos parâmetros de desempenho presentes na dada pesquisa, demonstraram benefícios da suplementação alimentar para a tilápia do Nilo. Em todos os parâmetros de crescimento e carcaça, os peixes submetidos aos alimentos funcionais, apresentaram resultados numericamente superiores ao controle, sem diferença significativa. A partir da conversão alimentar aparente, que trouxe efeito de significância estatística, foi possível confirmar o potencial uso do simbiótico para peixes, podendo supor um efeito sinérgico ou cumulativo das melhorias entre FAM e *S. cerevisiae*.

Os resultados do estudo realizado por Geraylou et al. (2013) com juvenis de *Acipenser baerii*, no qual forneceu dietas com aditivos pré, probióticos e combinações, encontraram respostas semelhantes a presente pesquisa. Os autores sugerem que a dieta de *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* ST G45 juntamente com 2% de AXOS (arabinosilano-oligossacarídeos), levou a um melhor desempenho nos peixes, não havendo influência da suplementação única. Encontraram ainda, com o fornecimento da dieta simbiótica, alterações significativas no microbioma intestinal e que a mesma impulsionou respostas imunes. Rodriguez-Estrada et al. (2009), no estudo da aplicação individual dietética de *Enterococcus faecalis* e mananoligossacarídeo (MOS), forneceram uma gama de benefícios no que diz respeito à resposta imunitária e sobrevivência num estudo de desafio. No entanto, observou-se que a alimentação simbiótica (*E. faecalis* + MOS) produziu significativamente melhores resultados do que a aplicação de forma individual, o que gera novas expectativas no quesito de atividade satisfatória aos aditivos promotores de crescimento e saúde.

Na prática, as misturas combinadas de prebióticos e probióticos são usadas em função dos efeitos sinérgicos, capazes de maximizar funções fisiológicas, assegurando o bem-estar e saúde do animal. Os prebióticos estimulam o crescimento dos grupos endógenos de população microbianas (SONG et al., 2014). Eles são resistentes à digestão enzimática, no intestino grosso são então fermentados (BRITO et al., 2013), proporcionando dessa forma um ambiente favorável ao crescimento e colonização de micro-organismos desejáveis (RINGO et al., 2010). Quando o probiótico é adaptado ao substrato (prebiótico), e estes consumidos em conjunto, podem resultar em vantagem competitiva sobre outros micro-organismos do ecossistema (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Esse comportamento é o que supostamente tenha ocorrido na pesquisa, pelo fato das macroalgas marinhas possuírem grandes quantidades de carboidratos e proteínas (BENEVIDES et al., 1998) com poder de substrato para *S. cerevisiae*. Foi observado a partir da contagem feita do intestino dos peixes experimentais, uma maior colonização por leveduras nos animais alimentados com a dieta simbiótica, seguido da *A. nodosum*. O cultivo tradicional para investigar a adesão e colonização de bactérias probióticas torna-se importante com o intuito de elucidar as suas capacidades metabólicas, como o melhor aproveitamento da dieta e, até a degradação de fatores antinutricionais, Refstie et al. (2005) demonstraram que a fermentação ácido láctica pode melhorar o valor nutritivo da farinha de soja em salmões do Atlântico (*Salmo salar*). Isto é altamente relevante para a nutrição, uma vez que um dos principais desafios na aquicultura é o aproveitamento de fontes de proteína vegetal em rações (GATLIN et al., 2007).

Entre os muitos benefícios de saúde atribuídos aos probióticos e prebióticos, a modulação do sistema imunológico é um dos benefícios mais esperados e sua capacidade de estimular a imunidade sistêmica e local (AKHTER et al., 2015). A sobrevivência foi elevada em todos os grupos antes do desafio (100%). Após os alevinos serem desafiados com *A. hydrophila*, verificou-se que a bactéria utilizada apresentou efeito virulento chegando a 70% de mortalidade no grupo controle. A resistência ao patógeno inoculado aumentou com o fornecimento dos aditivos alimentares, assim como para a CAA, a melhor resposta foi desenvolvida pelos animais alimentados com o simbiótico. Sendo mais um parâmetro confirmando a melhor atividade dos aditivos em conjunto. A administração de pré, pró e simbiótico no presente estudo, não apresentaram efeitos sobre a lisozima séria e IHS.

Trabalho realizado por Abu-Elala et al. (2013) no qual forneceu *S. cerevisiae* como probiótico, seu extrato (manano-oligossacarídeo - prebiótico) e uma pré-mistura dos dois (simbiótico), como promotores de crescimento e imunoestimulantes para *O. niloticus*, em

resposta, o aditivo simbiótico levou a um importante reforço na resistência inata dos peixes contra patógenos de peixes selecionados para desafio, dentre eles a *A. hydrophila*, bem como aumentou positivamente o desempenho dos peixes desafiados. Mehrabi et al. (2012), incluindo dieta simbiótica, para truta arco-íris teve efeito positivo no desempenho e sobrevivência.

Considerando a importância da tilápia do Nilo para a indústria do pescado, e as problemáticas e prejuízos de bactérias em causar enfermidades nos peixes, os resultados do presente estudo sugerem que a combinação dietética de *S. cerevisiae* e *A. nodosum* é favorável para promover o crescimento e desempenho e para impulsionar algumas respostas de resistência a *A. hydrophila* em tilápia do Nilo. Embora mais estudos devam ser realizados, para fornecer bases para que esse aditivo possa ser aplicado a nível industrial. Podendo, portanto, ser considerada como uma alternativa útil ao uso de tratamentos quimioterápicos afins de promover a saúde dos peixes.

5. Conclusão

O simbiótico testado apresentou um bom potencial para ser utilizado como aditivo para alevinos de tilápia do Nilo. A sua inclusão em níveis de 20 g.kg ração⁻¹ de *A. nodosum* e 6x10⁸ UFC. Kg ração⁻¹ de *S. cerevisiae* não provoca prejuízos ao crescimento e melhora os valores de conversão alimentar, sobrevivência e colonização do probiótico em tilápia do Nilo durante o período de alevinagem.

Agradecimentos: à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e a CODEVASF-PE pela importante parceria.

6. Referências bibliográficas

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN. A. M.; ISMAEL, N. E. M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, v. 280, p.185–189, 2008.

ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus*

challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. v. 1, p. 21–29, 2013.

AI, Q.; XU, H.; MAI, K.; XU, W., WANG, J., ZHANG, W. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, n. 317, p. 155-61, 2011.

AKHTER, N.; WU, B.; MEMON, A. M.; MOHSIN, M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*. v. 45 - 2, p. 733–741, 2015.

BENEVIDES N. M. B.; SILVA, S. M. S.; MAGALHÃES, S. R.; MELO, F. R.; FREITAS, A. L.; VASCONCELOS, P. I. M. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten Brazilian marine algae. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 10, p. 31, 1998.

BRANDEN, K.W.; BLANTON, J.R.; MONTGOMERY, J.L.; VAN SANTEN, E.; ALLEN, V.G. AND MILLER, M.F. Tasco supplementation: effects on carcass characteristics, sensory attributes, and retail display shelf-life. *American Society of Animal Science*, n.85.p. 754-768, 2007.

BRITO, J. M.; FERREIRA, A. H. C.; JÚNIOR, H. A. S.; ARARIPE, M. N. B. A.; LOPES, J. B.; DUARTE, A. R.; CARDOSO, E. S.; RODRIGUES, V. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes – Revisão. *Revista eletrônica nutritime – www.nutritime.com.br*, art. 205, v. 10, n. 04, p. 2525 – 2545, 2013.

CASAS-VALDEZ, M.; PORTILLO-CLARK, G.; AGUILA-RAMÍREZ, N.; RODRÍGUEZ-ASTUDILLO, S.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, I.; CARRILLO-DOMÍNGUEZ, S. Effect of the marine algae *Sargassum* spp. on the productive parameters and cholesterol content of the brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, n. 41-1, p. 97–105, 2006.

CASCON, A.; YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; SÁNCHEZ, M.; HERNANZ, C.; LUENGO, J. M.; NAHARRO, G. A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and immunity*, v. 68, n. 6, p. 3233–3241, 2000.

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F. A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish Shellfish Immunol*, v. 32, p. 1032-40, 2012.

CHIU, C.-H.; CHENG, C.-H.; GUA, W.-R.; GUU, Y.-K.; CHENG, W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, n. 29, p. 1053-1059, 2010.

COSTA, M. M.; OLIVEIRA, S. T. L.; BALEN, R. E.; BUENO JUNIOR, G.; BALDAN, L. T.; SILVA, L. C. R.; SANTOS, L. D. Brown seaweed meal to Nile tilapia fingerlings. *Archivos de Zootecnia*, v. 62, n. 237, p. 109, 2013.

CRUZ, P.; IBÁÑEZ, A. L.; HERMOSILLO, O. A. M.; SAAD, H. C. R. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network (ISRN Microbiology)*, Article ID 916845, p. 13, 2012.

DAVIES, S. J.; BROWN, M. T.; CAMILLERI, M. Preliminary assessment of the seaweed *Porphyra purpurea* in artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*), *Aquaculture*, n. 152, p. 249–258, 1997.

- EL-BOSHY, M.E.; EL-ASHRAM, A.M.; ABDELHAMID, F.M.; GADALLA, H.A. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. v.28, p.802-808, 2010.
- ELLIS, A.E. Lysozyme assay. In: Stolen JS, Fletcher DP, Anderson BS, Robertson BS, editors. *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publication; p. 101-3, 1990.
- FIKE, J.H. ; SAKER, K.E. ; O'KEEFE, S.F.; MARRIOTT, N.G.; WARD, D.L.; FONTENOT, J.P.; VEIT, H.D. Effects of (a seaweed extract) and heat stress on N metabolism and meat fatty acids in wether lambs fed hays containing endophyteinfected fescue. *Small Ruminant Res*, n. 60, p. 237-245, 2005.
- FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Science & Technology*, n. 10, p. 25-28, 1999.
- GABRIELSEN, B.O.; AUSTRENG, E. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, fed wet feed with alginate. *Aquaculture Research*, n. 29, p. 397-401, 1998.
- GATLIN, D.M.; BARROWS, F.T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T.G.; HARDY, R.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, Å.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E.J.; STONE, D.; WILSON, R.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture*, n. 38, p. 551-579, 2007.
- GENG, X.; DONG, X. H.; TAN, B.P.; YANG, Q. H.; CHI, S. Y.; LIU, H. Y.; LIU, X. Q. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunology* v. 31, p. 400-6, 2011.
- GERAYLOU, Z.; SOUFFREAU, C.; RURANGWA, E.; MEESTER, L. D.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A.; BUYSE, J.; OLLEVIER, F. Effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and endogenous probiotics on the growth performance, non-specific immunity and gut microbiota of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish & shellfish immunology*, v. 35, p. 766-775, 2013.
- GHATAK, S.; AGARWAL, R.K.; BHILEGAONKAR, K.N. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, p.550-554, 2007.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.D. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; SHI, P.; YAO, B.; RING, E.; YOON, I. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) cultured in cages. *Aquaculture*, v. 294, p. 99-107, 2009.
- HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D.J.; LOGATO, P.V.R.; PICCOLI, R.H.; FIGUEIREDO, H.C.P. (2006). Identificação e resitência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas móveis* isoladas de peixes e ambiente aquáticos. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 30 (6): 1211-1217.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. "Probiotics in aquaculture," *Journal of Fish Diseases*. v. 25, n. 11, p. 633–642, 2002.
- KUBITZA, F. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundaí, SP – Brasil, ed. 1, p. 229, 2003.
- LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMAN-MÉNDEZ, B.E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 216, p. 193–201, 2003.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.
- MEHRABI, Z.; FIROUZBAKHSH, F.; JAFARPOUR, A. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *J Anim Physiol Anim Nutr*, n. 96, p. 474-481, 2012.
- MEIRELLES, F. S. de. Estudo epidemiológico das infecções bacterianas em tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivadas em Pernambuco. 2010. 77f. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.
- MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R.T. M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, n. 302, p. 1-18, 2010.
- MUSTAFA, M.G.; WAKAMATSU, S.; TAKEDA, T.A.; UMINO, T.; NAKAGAWA, H. Effects of algae meal as feed additive on growth, feed-efficiency, and body-composition in red-sea bream. *Fisheries Sci*, v. 61(1), p. 25-28, 1995.
- NAKAGAWA, H.; UMINO, T.; TASAKA, Y. Usefulness of *Ascophyllum meal* as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 151, p. 275-281, 1997.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M2-A7. Wayne, NCCLS, 2000.
- OBACH, A.; QUENTEL, C.; BANDIN, L.F. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis Aquat Org*, v.15, p. 175-85, 1993.
- OLIVEIRA, S. T. L.; VENERONI-GOUVEIA, G.; SANTOS, A. C.; SOUSA, S. M. N.; VEIGA, M. L.; KREWER, C. C.; COSTA, M. M. *Ascophyllum nodosum* in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect after inoculation of *Aeromonas hydrophila*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n. 4(5), p. 403-408, 2014.
- PHAM, M. A.; LEE, K.-J.; LEE, B.-J.; LIM, S.-J.; KIM, S.-S.; LEE, Y.-D.; HEO, M.-S.; LEE, K.-W. Effects of dietary *Hizikia fusiformis* on growth and immune responses in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Asian–Australasian Journal of Animal*, n. 19-2, p. 1769–1775, 2006.
- QUINN, P.J.; CARTEY, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Vibrio* species In.: *Microbiology Veterinary Clinical*, Virginia-USA, Sec. 2, Cap. 20, p. 243-247, 1994.

- REFSTIE, S.; SAHLSTRÖM, S.; BRÅTHEN, E.; BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, Å.; Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, n. 246, p. 331–345, 2005.
- RINGO, E.; OLSEN, R.E.; GIFSTAD, T.O.; DALMO, R.A.; AMLUND, H.; HEMRE, G.I.; BAKKE, A. M. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, N. 16, P. 117-36, 2010.
- RODRIGUEZ-ESTRADA, U.; SATOH, S.; HAGA, Y.; FUSHIMI, H.; SWEETMAN, J. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Scientia*, n. 57, p. 609-17, 2009.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C. Tabelas Brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais. Editora UFV, Viçosa, p. 141, 2000.
- SANTOS, P.G.; SANTOS, P. A.; BELLO, A. R.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. *Applied Microbiology*, n. 52, p. 49-55, 2010.
- SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition1–3. *The American journal of clinical nutrition*. n. 73, p. 361S–4S, 2001.
- SEN, K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can. J. Microbiol*, p. 51: 957-966. 2005.
- SOLER-VILA, A.; COUGHLAN, S.; GUIRY, M. D.; KRAAN, S. The red alga *Porphyra dioica* as a fishfeed ingredient for rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, feed efficiency, and carcass composition, *Journal of Applied Phycology*, n. 21, p. 617–624, 2009.
- SONG, S. K.; BECK, B. R.; KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; KIM, H. D.; RINGOD, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 40 - 1, p. 40–48, 2014.
- VALENTE, L. M. P.; GOUVEIA, A.; REMA, P.; MATOS, J.; GOMES, E. F.; PINTO, I. S. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles, *Aquaculture*, n. 252, p. 85–91, 2006.
- WACHÉ, Y., AUFRAY, F., GATESOUBE, F.J., ZAMBONINO, J., GAYET, V., LABBÉ, L., QUENTEL, C. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258, 470–478, 2006.
- WANG, Y. B. J.; LI, R.; LIN, J. “Probiotics in aquaculture: challenges and outlook,” *Aquaculture*. v. 281, n. 1–4, p. 1–4, 2008.
- WASSEF, E. A.; EL MASRY, M. H.; MIKHAIL, F. R. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquaculture Research*, n. 32 (Suppl. 1), p. 315–322, 2001.
- YE, J. D.; WANG, K.; LI, F.D.; SUN, Y. Z. Single or combined effects of fructo- and mannanoligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition* n.17, p. 902-11, 2011.

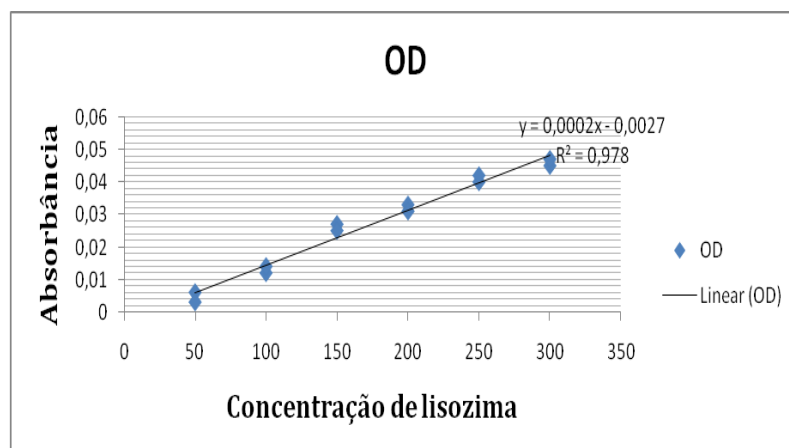
5. Considerações finais

A partir dos resultados encontrados é possível admitir o potencial uso de alimentos funcionais para peixes. Os resultados ainda são dependentes da quantidade do suplemento fornecido.

Em função dos seus benefícios quanto a melhor utilização do alimento como ocorreu para o EEP, OEO o probiótico e o prebiótico e / ou quanto ao fortalecimento do sistema imunológico, como verificados com o uso do simbiótico.

O potencial uso de produtos naturais na alimentação de peixes, em função dos seus benefícios quanto a melhor utilização do alimento e / ou quanto ao fortalecimento do sistema imunológico. A manipulação da flora bacteriana intestinal por meio de suplementação dietética de aditivos alimentares benéficos é uma nova abordagem não só do ponto de vista nutricional, mas também para reverter os efeitos adversos antimicrobianoterapia e falta de vacinas eficazes. Não deixam resíduos na carne ou no ambiente, assim como não contribui para seleção bacteriana antibióticorresistente. Embora mais pesquisas nesse âmbito devam ser realizadas, com em outras fazes de cultivo e espécies de peixes.

ANEXOS:

**Figura 1:** Curva de calibração da lisozima.



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Aditivos alimentares para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu potencial no combate aos efeitos da infecção por *Aeromonas hydrophila***”, protocolo nº **0006/160812**, que utiliza 996 animais das espécies *Oreochromis niloticus*, sob a responsabilidade de **Mateus MatiuZZi da Costa**, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

(We certify that the Research “**Food additives for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential in combating the effects of infection with *Aeromonas hydmpfila***” protocol number **0006/160812**, utilizing 996 males animals species *Oreochromis niloticus*, under the responsibility **Mateus MatiuZZi da Costa**, complies with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Animal and Human Ethic Commission of Universidade Federal do Vale do São Francisco).

Petrolina, 30 de janeiro de 2013.

Prof. Alexandre H. Reis

Presidente do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF
Coordenador interino da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNIVASF