

## DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS AUTÓCTONE E ALÓCTONE PARA CAMARÃO DA MALÁSIA

### DEVELOPMENT AND EVALUATION OF AUTOCHTHONOUS AND ALLOCHTHONOUS PROBIOTICS FOR GIANT RIVER PRAWN

**Autores:** Julio Cesar Bailer RODHERMEL<sup>1</sup>; Amanda DARTORA; Laura Rafaela DA SILVA, Renata KRAINZ, Marcos Tirone KRUGER, Adolfo JATOBÁ<sup>2</sup>.

**Identificação autores:** <sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq, Medicina Veterinária; <sup>2</sup>Orientador: IFC – Campus Araquari.

#### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a microbiologia intestinal de camarões alimentados com bactérias autóctones e alóctones de Camarão da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*). O trabalho foi dividido em três etapas: 1º) isolamento de bactérias ácido lácticas; 2º) seleção *in vitro*; e 3º) teste *in vivo*. A cepa isolada C211 apresentou a melhor inibição média ( $0,98 \pm 0,26\text{cm}$ ), menor resistência a antibióticos ( $1,51 \pm 0,70\text{cm}$ ). Após 30 dias do ensaio *in vivo*, os camarões alimentados com as bactérias ácidos-lácticas apresentaram maior contagem deste grupo o trato intestinal dos camarões ( $6,54 \pm 0,25$  UFC) em relação ao controle ( $5,17 \pm 0,70$  UFC).

**Palavras-chave:** Carcinicultura; suplementação; microbiologia.

#### ABSTRACT

(um espaço simples em branco)

This work aimed to evaluate the gut microbiology of prawns fed with autochthonous and allochthonous bacteria of Giant River Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). The project had three stages: 1º) isolation of acid lactic bacteria; 2º) *in vitro* selection; and 3º) *in vivo* test. The isolated strain C211 showed better average inhibition ( $0,98 \pm 0,26\text{cm}$ ), less resistance to antibiotics ( $1,51 \pm 0,70\text{cm}$ ). After thirty days of *in vivo* assay, the prawns fed with acid lactic bacteria showed higher number of UFC of this bacteria in the gut ( $6,54 \pm 0,25$  UFC) when compared to the control group ( $5,17 \pm 0,70$  UFC).

**Keywords:** Prawn farming; supplementation; microbiology.

#### INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A expansão da atividade aquícola predispõe ao surgimento de enfermidades, principalmente pela elevada densidade de estocagem, má qualidade de água, práticas inadequadas no manejo, e escassez de medidas sanitárias (ABOELHADID, 2012), sendo o uso de substâncias quimioterápicas, em especial os antibióticos, o

principal método remediativo aplicado pelos produtores, com o objetivo de combater os surtos de enfermidades e reduzir as mortalidades (ABASALI & MOHAMED, 2010). Porém, o uso excessivo e indiscriminado destes fármacos, desencadeia uma série de efeitos negativos, tanto na qualidade do produto final, por poder deixar resíduos na carne, quanto no ambiente, através da poluição dos mananciais (HU et al., 2014), e pelo aumento da pressão de seleção sobre os agentes patogênicos, promovendo a resistência destes e conseqüentemente seu difícil controle (GUARDABASSI et al., 2010).

Com esta problemática, avançaram-se estudos sobre probióticos, assim como dos benefícios aos seus hospedeiros, pois os probióticos autóctones e alóctones já demonstraram ser uma ferramenta profilática viável para a prevenção de enfermidades, havendo diversos trabalhos que demonstram seus efeitos benéficos aos peixes (STANDEN et al., 2016).

Então, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo do uso de probióticos autóctones e alóctones no manejo alimentar do camarão da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*), contribuindo com a melhoria de técnicas ambientalmente amigáveis à carcinicultura.

## METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari (IFC – CA).

### Isolamento das bactérias ácido lácticas

Foram selecionados 15 camarões da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*) saudáveis. Posteriormente, foram coletadas amostras dos intestinos, para isto os camarões foram anestesiados em eugenol (50mg.L<sup>-1</sup>) e sacrificados por comoção cerebral. As amostras foram maceradas com solução salina estéril 0,65% de NaCl (SSE), diluídas serialmente (fator 1:10) e semeadas em Petri com meio de cultura Agar Man Rogosa Sharpe (MRS). As placas semeadas foram incubadas por 48h em estufa a 35oC. Após a incubação, as colônias foram identificadas morfológicamente pelo método de coloração de Gram. As de interesse (cocos e bacilos Gram positivos) foram semeadas em novo meio de cultura Agar MRS para isolamento por esgotamento em placa.

### Seleção in vitro das bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas isoladas foram selecionadas *in vitro* através da capacidade inibitória contra *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophyla*. A inibição in vitro será realizada de acordo com Jatobá et al. (2008).

### Ensaio de colonização e especificidade das bactérias ácido-láticas autóctones e alóctones

Para esta avaliação as dietas foram preparadas de acordo com o descrito em Jatobá et al. (2008), garantindo as concentrações mínimas de 1 x 10<sup>7</sup> unidades

formadoras de colônia (UFC) por g de ração. Serão preparadas três dietas: 1<sup>a</sup>) bactéria autóctone, a bactéria ácido-lática com melhor resultado na “seleção *in vitro*”; 2<sup>a</sup>) bactéria alóctone, dieta probiótica isolada e aprovada em testes *in vitro* e *in vivo* para *Litopenaeus vannamei*; 3<sup>a</sup>) dieta controle, sem bactérias. Para isto 30 camarões foram distribuídos inteiramente ao acaso, em 6 caixas de polietileno (60 L), 5 animais por caixa, equipadas com sistema de recirculação constante e filtro biológico, e divididas em três tratamentos, em duplicata. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 16 horas) com ração comercial com 42% Proteína Bruta (GUABI®), durante 30 dias consecutivos, de acordo com os tratamentos previamente estabelecidos. O oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram mensuradas duas vezes ao dia, e pH semanalmente. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia, com 3% da sua biomassa, e semanalmente foram realizadas biometrias para correção da alimentação.

### **Avaliação microbiota do trato intestinal**

Trinta dias após o ensaio de colonização, os animais permaneceram 24 horas de jejum para coleta do trato intestinal. Para isto os camarões foram anestesiados em eugenol (50mg.L<sup>-1</sup>) e sacrificados por comoção cerebral, foram coletados um “pool” de 3 camarões, por unidade experimental. Os tratos serão macerados e diluídos serialmente (fator 1:10) em SSE 0,65%. As amostras de cada diluição foram semeadas em meio TSA, Agar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS), Agar Cetrimide e Agar MRS, e incubados por 48h a 30°C, para contagem de bactérias totais, vibriáceas, Pseudomonas e ácidoláticas, respectivamente.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se a distribuição de dados está dentro da curva de normalidade, e ao teste de Levene para verificar sua homocedasticidade. Os dados obtidos que atenderem aos pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade, foi aplicado ANOVA para se observar a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos, caso positivo será utilizado o teste SNK para separação de médias. Foi utilizada 5% de significância para todas as avaliações (ZAR, 2010).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Em relação as bactérias selecionadas *in vitro* através da capacidade inibitória contra patógenos, a cepa que possuiu melhores resultados foi a C421. O patógeno menos inibido pelas quatro melhores cepa foi o *Streptococcus aureus*, enquanto que o patógeno mais inibido foi o *Citrobacter freundii*. Já o probióticos *Lactobacillus plantarum*, utilizado da colonização *in vivo*, obteve resultados melhores do que todas as cepas isoladas. (Tabela1).

**Tabela 1.** Halo de inibição (cm) das melhores cepas isoladas do camarão (*M. rosenbergii*) e *Lactobacillus plantarum* contra bactérias patogênicas.

Cepas	C211	C333	C421	C424	<i>L. plantarum</i>
<i>Aeromonas veroni</i>	0,75 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,08 <sup>a0</sup>	0,78 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,12 <sup>b</sup>
<i>A. hydrophila</i>	1,20 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,19 <sup>b</sup>
<i>Citrobacter freundii</i>	1,20 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,25 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus aureus</i>	0,75 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,06 <sup>bb</sup>	0,73 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,55 <sup>b</sup>
<b>Média geral</b>	0,98 ± 0,26	0,66 ± 0,28	0,93 ± 0,20	0,81 ± 0,13	1,18 ± 0,46

Enquanto que o antibiograma demonstrou eficiência contra as cepas ácido láticas, o que demonstra segurança sobre o controle e não desenvolvimento de cepas multirresistentes. O antibiótico de melhor eficácia foi a amoxicilina e o de menor combate a clindamicina (Tabela 2).

**Tabela 2.** Antibiograma (cm) das melhores cepas isoladas e *Lactobacillus plantarum* contra quatro antibióticos.

Antibióticos	C211	C333	C421	C424	<i>L. plantarum</i>
<u>Amoxicilina</u>	2,60 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,31 <sup>a</sup>
Cloranfenicol	1,97 ± 0,31 <sup>ab</sup>	1,57 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,12 <sup>b</sup>	2,53 ± 0,21 <sup>b</sup>
Clindamicina	0,77 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,53 ± 0,47 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,40 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,40 ± 0,17 <sup>c</sup>
Eritromicina	2,23 ± 0,35 <sup>bc</sup>	1,93 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,21 <sup>ab</sup>	2,50 ± 0,36 <sup>b</sup>
<b>Média geral</b>	1,51 ± 0,70	1,01 ± 0,90	0,88 ± 0,75	1,29 ± 1,09	1,73 ± 0,99

A análise microbiológica da ração utilizada em teste *in vivo* demonstrou que ao incrementar 10% de bactéria crescida em meio M.R.S. deixada por 24h na estufa bacteriológica a 35°C, a suplementação de *Lactobacillus plantarum* desempenha maior número de unidades formadoras de colônia do que a bactéria isolada C421, o que mostra maior crescimento (Tabela 3).

A análise microbiológica da ração utilizada em teste *in vivo* demonstrou que ao incrementar 10% de bactéria crescida em meio M.R.S. deixada por 24h na estufa bacteriológica a 35°C, a suplementação da *Lactobacillus plantarum* apresentou uma maior contagem de bactérias após inoculação, com contagem 10 vezes maior,  $4,0 \times 10^7$  para dietas da cepa C211 UFC por g de ração e  $3,3 \times 10^8$  UFC por g de ração, para dietas suplementada com *L. plantarum*, respectivamente.

Depois do ensaio de colonização *in vivo*, foi feita microbiologia do trato gastrointestinal dos camarões, a qual demonstrou que não houve diferença no número de bactérias que colonizam o trato (Tabela 4).

**Tabela 4.** Concentração de bactérias do trato intestinal de camarões.

Tratamentos	Bactérias heterotróficas totais	<i>Vibrios sp.</i>	Bactérias Ácido-láticas
<b>Controle</b>	8,18 ± 1,22 <sup>a</sup>	7,17 ± 0,73 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,75 <sup>a</sup>
<b>C211</b>	8,26 ± 0,46 <sup>a</sup>	7,07 ± 1,48 <sup>a</sup>	6,54 ± 0,25 <sup>a</sup>
<b><i>L. plantarum</i></b>	7,98 ± 1,37 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,91 <sup>a</sup>	5,68 ± 0,80 <sup>a</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Então, concluímos que a bactéria C211 demonstrou potencial probiótico em testes *in vitro* e *in vivo*, pois a bactéria isolada colonizou o trato dos camarões, sendo necessário novos estudos com a cepa isolada para confirmar e conhecer suas características probióticas.

## REFERÊNCIAS

ABASALI, Hajibeglou; MOHAMAD, Sudagar. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. **Agricultural Journal**, v. 5, n. 3, p. 163-172, 2010.

GUARDABASSI, Luca; JENSEN, Lars B.; KRUSE, Hilde. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmed, p.17–30. 2010.

JATOBÁ, Adolfo et al. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. 2017. **Produção de tilápia cresce mais de 200% no Brasil**. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/04/producao-de-tilapia-cresce-200-em-dez-anos-no-brasil>>. Acesso em 10/02/2018.

STANDEN, B. T. et al. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 49, p. 427-435, 2016.

ZAR, Jerrold H. Biostatistical analysis. 5th ed. **Pearson Prentice Hall**, Upper Saddle River. NJ, 994p, 2010.