

Norha Constanza Bolívar Ramírez

Avaliação do uso de sais orgânicos em conjunto com probióticos no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção de grau de Doutor em Aquicultura

Orientador: Edeimar Roberto Andreatta  
Co-orientador: Felipe do Nascimento Vieira

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramírez, Norha Constanza

Avaliação do uso de sais orgânicos em conjunto com probióticos no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* / Norha Constanza Ramírez ; orientador, Edegar Roberto Andreatta ; coorientador, Felipe do Nascimento Vieira. - Florianópolis, SC, 2016.

88 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. *Lactobacillus plantarum*. 4. *Vibrio alginolyticus*. 5. butirato de sódio. I. Andreatta, Edegar Roberto. II. Vieira, Felipe do Nascimento. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Avaliação do uso de sais orgânicos em conjunto com probióticos no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei***

Por

NORHA CONSTANZA BOLÍVAR RAMÍREZ

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOUTOR EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



---

Dr. Edegar Roberto Andreatta – *Orientador*



---

Dr. Luís Henrique da Silva Poersch - FURG




---

Dr. Marcelo Maraschin - UFSC



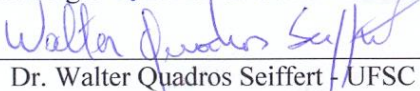
---

Dr. Mauricio Lehmann - IFSC



---

Dr. Sérgio Winckler da Costa - EPAGRI



---

Dr. Walter Quadros Seiffert - UFSC



Dedicado a minha mãe Cristina, meu pai Germán, minha irmã Marcela e a meu namorado Dimas.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Edegar R. Andreatta pelos valiosos ensinamentos na área da carcinicultura e sua inestimável compreensão.

Ao meu coorientador Felipe Vieira pelo grande apoio, compreensão e paciência durante todo o experimento.

O José Luiz Mourão e Bruno Correa pelas valiosas contribuições e ajuda.

Ao Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI-UFSC), em especial ao Fernando Brignol, Maria Fernanda Oliveira e o Luiz Eduardo Lima de Freitas pela grande colaboração na elaboração da ração.

Ao Delano e Cristhiane na elaboração das análises dos parâmetros imunológicos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do setor de Microbiologia (LCM): Marysol, Joselle, Juliana, Mariana, Gabriel, Gabi Soltes, Fernanda, Ariane, Scheila, Tamiris, Lincoln e Priscila que colaboraram direta ou indiretamente na realização dos meus experimentos de tese e por tornarem as horas de trabalho em horas mais amenas.

Ao Carlito pela prestatividade e paciência na secretaria da PGAQI.

A CAPES PEC-PG pelo apoio financeiro concedido para realização dos meus estudos.

A todos os professores do Departamento de Aquicultura.

A todos os funcionários do LCM por sua grande colaboração na realização dos experimentos.

Ao Dimas meu amigo e companheiro pelo apoio incondicional.

E finalmente, aos meus pais Germán e Cristina e minha irmã Marcela, por serem o motor que me incentiva sempre a continuar em frente.





Dulcineia

Quem tu és não importa, nem conheces  
O sonho em que nasceu a tua face:  
Cristal vazio e mudo.  
Do sangue de Quixote te alimentas,  
Da alma que nele morre é que recebes  
A força de seres tudo.  
José Saramago



## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de diferentes sais orgânicos para serem usados em conjunto com o probiótico *Lactobacillus plantarum* e posteriormente avaliar o efeito *in vivo* no desempenho de *Litopenaeus vannamei*. Os resultados mostraram que o citrato e formiato de sódio inibiram o crescimento do *L. plantarum* enquanto que o fumarato, succinato e glutamato estimularam seu crescimento. Os demais sais orgânicos não influenciaram no crescimento do probiótico. O butirato, acetato e propionato de sódio apresentaram maior poder inibitório contra *V. alginolyticus*, o propionato de sódio contra *A. hydrophyla*, *E. coli*, e *P. aeruginosa* e o fumarato de sódio contra o *S. agalactiae*. No segundo experimento foi realizado utilizando o butirato de sódio incorporado na ração do camarão junto com o probiótico resultando em quatro dietas diferentes: a) butirato de sódio; b) probiótico; c) butirato de sódio +probiótico; d) controle. Após quatro semanas, não houve diferença significativa nos parâmetros zootécnicos ou nas contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais do trato intestinal nos camarões dos diferentes tratamentos. A contagem de bactérias ácido lácticas foi superior no trato intestinal dos camarões que receberam o probiótico na dieta. Não foram encontradas interações dos tratamentos nos parâmetros imunológicos avaliados. No desafio experimental com *V. alginolyticus*, os camarões dos tratamentos tiveram uma maior sobrevivência comparados com o controle. Conclui-se que os sais orgânicos aumentaram seu poder inibitório *in vitro* na presença do probiótico, entre os sais orgânicos avaliados o butirato de sódio apresentou maior potencial para ser utilizado em conjunto com o *L. plantarum* frente a *V. alginolyticus* e que o uso de probióticos e sais orgânicos aumentaram significativamente a sobrevivência do camarão frente à infecção como patógeno.

Palavras chaves: Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, *Lactobacillus plantarum*, *Vibrio alginolyticus*, butirato de sódio, desafio.



## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* effect of different organic salts to be used in conjunction with the probiotic *L. plantarum* and subsequently evaluate the effect *in vivo* in the performance of *L. vannamei*. The results showed that the citrate and sodium formate inhibited the growth of *L. plantarum* while sodium fumarate, succinate and glutamate stimulated its growth. The remaining organic salts did not influence the growth of the probiotic. Sodium butyrate, acetate and propionate had the higher power inhibitory effect against *V. alginolyticus*, sodium propionate against *A. hydrophyla*, *E. coli* and *P. aeruginosa* and sodium fumarate against *S. agalactiae*. The best organic salt of the *in vitro* test was incorporated in the shrimp feed along with the probiotic resulting in four different diets: a) organic salt; b) probiotic; c) organic salt+probiotic; d) control. After four weeks of cultivation, there was no significant difference between the different treatments in zootechnical parameters or in the counts of *Vibrio* spp. and total heterotrophic bacteria of the intestinal tract of shrimps. The lactic acid bacteria count was higher in the intestinal tract of shrimps who received the probiotic in the diet. Interactions were not found between the treatments in immunological parameters of evaluated. After experimental challenge, the shrimps of the treatments had a greater survival compared with the control group. We can conclude that the organic salts increased its *in vitro* power inhibitory effect in the presence of the probiotic against different pathogens, between organic salts evaluated sodium butyrate presented greater potential to be used in conjunction with the *L. plantarum* against *V. alginolyticus* and, that the use of probiotics and organic salts significantly increased the survival of shrimp after infection with *V. alginolyticus*.

Keywords: Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, *Lactobacillus plantarum*, *Vibrio alginolyticus*, sodium butyrate



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 Concentração (C), velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e tempo de duplicação (tdup) de <i>L. plantarum</i> com diferentes sais orgânicos em dois valores de pH.....                    | 44 |
| Tabela 2 Concentração inibitória mínima (mM) dos diferentes sais orgânicos (pH 6.2) na presença ou ausência do probiótico bactéria <i>L. plantarum</i> contra diferentes bactérias patogênicas.....         | 47 |
| Tabela 3 Concentração inibitória mínima (mM) dos diferentes sais orgânicos (pH 7.1) na presença ou ausência do probiótico bactéria <i>L. plantarum</i> contra diferentes bactérias patogênicas.....         | 48 |
| Tabela 4 Composição da dieta referência utilizada no ensaio de crescimento em água clara com <i>L. vannamei</i> .....   | 59 |
| Tabela 5 Composição centesimal das dietas utilizadas para engorda de <i>L. vannamei</i> em água clara. ....   | 60 |
| Tabela 6 Frequência de escolhas positivas (%) dos camarões <i>L. vannamei</i> mantidos no labirinto em Y alimentados com diferentes dietas. ....  | 64 |
| Tabela 7 Parâmetros zootécnicos de <i>L. vannamei</i> cultivado em água clara e alimentado com diferentes dietas.....   | 64 |
| Tabela 8 Contagem microbiológica (log) de intestino de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes dietas após quatro semanas de cultivo. ....  | 65 |
| Tabela 9 Contagem total de hemócitos (CHT), proteína do soro, atividade de fenoloxidase (PO) e título aglutinante do camarão <i>L. vannamei</i> antes e depois do desafio com <i>V. alginolyticus</i> ..... | 66 |
| Tabela 10 Sobrevivência de <i>L. vannamei</i> após desafio com <i>V. alginolyticus</i> . ....   | 67 |





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Cinética de crescimento de *L. plantarum* durante 24 horas, expressadas em unidades formadoras de colônias (CFU mL<sup>-1</sup>) com adição de sais orgânicos a pH 6.2 (A) e 7.1 (B). ..... 43
- Figura 2 Concentração final de *L. plantarum* com diferentes sais orgânicos em dois valores de pH após 24 horas de crescimento. .... 45



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. CAPITULO I: Introdução .....  | 21 |
| 2. Probióticos.....  | 22 |
| 2.1. Definição.....  | 22 |
| 2.2. Mecanismo de ação dos probióticos.....  | 22 |
| 2.2.1. Equilíbrio da microbiota intestinal .....   | 23 |
| 2.2.2. Melhora da digestão de nutrientes .....   | 24 |
| 2.2.3. Estimulação do sistema imune.....   | 25 |
| 2.3. Bactérias usadas como probióticos e seus efeitos na aquicultura..   | 26 |
| 2.3.1. Bactérias Gram negativas .....  | 26 |
| 2.3.2. Bactérias Gram positivas .....  | 28 |
| 3. Ácidos orgânicos e seus sais .....  | 30 |
| 3.1. Mecanismos de ação e os efeitos dos sais orgânicos e seus na aquicultura.....                               | 30 |
| 3.1.1. Inibição de bactérias patogênicas .....   | 30 |
| 3.1.2. Melhora na digestão de nutrientes .....   | 31 |
| 3.1.3. Melhora nos índices zootécnicos .....   | 32 |
| 4. Uso em conjunto de sais orgânicos e probióticos na produção animal.....                                       | 33 |
| 5. JUSTIFICATIVA.....  | 33 |
| 6. OBJETIVOS .....   | 35 |
| 6.1. Objetivo geral.....   | 35 |
| 6.2. Objetivos específicos.....  | 35 |
| 7. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....   | 35 |
| 8. CAPÍTULO II: Artigo original .....  | 37 |
| 9. Introdução .....  | 37 |
| 10. Material e métodos .....   | 39 |
| 10.1. Material biológico e sais orgânicos .....  | 39 |
| 10.2. Efeito in vitro de sais orgânicos sobre o crescimento da bactéria probiótica <i>L. plantarum</i> .....     | 39 |
| 10.3. Efeito in vitro de oito sais orgânicos e de <i>L. plantarum</i> frente a diferentes patógenos .....        | 41 |
| 10.4. Análises estatísticas.....   | 42 |
| 11. Resultados .....   | 42 |
| 11.1. Efeito in vitro de sais orgânicos sobre o crescimento da bactéria probiótica <i>L. plantarum</i> .....     | 42 |
| 11.2. Efeito in vitro dos sais orgânicos e a bactéria probiótica frente a diferentes bactérias patogênicas ..... | 45 |
| 12. Discussão.....   | 49 |
| 13. Conclusões .....   | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 14. Agradecimentos .....                             | 52 |
| 15. Referencias .....                                | 52 |
| 16. CAPITULO III: Artigo original .....              | 56 |
| 17. Introdução .....                                 | 56 |
| 18. Metodologia .....                                | 58 |
| 18.1. Preparação das dietas .....                    | 58 |
| MU: matéria úmida .....                              | 60 |
| 18.2. Teste de atratividade .....                    | 60 |
| 18.3. Engorda em água clara .....                    | 60 |
| 18.3.1. Parâmetros zootécnicos .....                 | 61 |
| 18.3.2. Microbiota intestinal .....                  | 61 |
| 18.3.3. Parâmetros imunológicos .....                | 61 |
| 18.4. Desafio frente a <i>V. alginolyticus</i> ..... | 62 |
| 18.5. Análises estatísticas .....                    | 63 |
| 19. Resultados .....                                 | 63 |
| 19.1. Teste de atratividade .....                    | 63 |
| 19.2. Engorda em água clara .....                    | 64 |
| 20. Discussão .....                                  | 67 |
| 21. Conclusões .....                                 | 69 |
| 22. Referencias .....                                | 69 |
| 23. CONCLUSOES GERAIS .....                          | 75 |
| 24. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....                  | 76 |

## 1. CAPÍTULO I: Introdução

A produção aquícola mundial cresceu progressivamente nas últimas décadas a uma taxa média anual de 3,2 por cento, atingindo uma produção de 97,2 milhões de toneladas em 2013 (FAO 2015) e superando pela primeira vez a captura (93,7 milhões de toneladas). Adicionalmente, a produção mundial de camarões marinhos em cativeiro, atingiu a marca de 4,4 milhões de toneladas produzidas em 2013 (FAO 2015).

O camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, é a espécie mais cultivada sendo responsável por 73,2% do volume total produzido (FAO, 2012). Contudo, a intensificação dos cultivos, a poluição e os distúrbios ecológicos e alimentares levaram ao surgimento de doenças no cultivo de camarões (KAUTSKY et al., 2000) principalmente de origens virais e bacterianas, resultando em perdas importantes nos cultivos (LIGHTNER, 2011).

Segundo a FAO (2014) os volumes de produção de cultivo de camarão diminuíram em 2012 e particularmente em 2013 como resultado da aparição de diferentes enfermidades, como a síndrome da mortalidade precoce (EMS, Early Mortality Syndrome) causada por uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, em alguns países da Ásia e América Latina (LIGHTNER et al., 2012; TRAN et al., 2013).

Infecções causadas por bactérias do gênero *Vibrio* são consideradas um problema importante no cultivo de camarões, tendo como sintomas anorexia, inatividade, baixa taxa de crescimento, necrose muscular e conseqüentemente mortalidades (CHIU et al., 2007).

Como tratamento contra as vibrioses, os antibióticos têm sido comumente utilizados. Embora, algum destes produtos possa diminuir a incidência de mortalidades, o mau uso na aquicultura tem levado ao aparecimento de bactérias resistentes (DEFOIRD et al., 2011). Adicionalmente, existe uma preocupação sobre os impactos potenciais que os resíduos químicos possam causar na saúde humana e ao meio ambiente (GRASLUND et al., 2003). Devido a isto, a União Europeia proibiu o uso de antibióticos na produção animal, sendo esta uma tendência mundial.

Portanto, medidas para proteger os cultivos sem uso de antibióticos estão sendo testadas e adotadas por produtores do mundo inteiro como, por exemplo, o uso de probióticos e mais recentemente de sais orgânicos, que possuem a capacidade de inibir bactérias patogênicas sem serem tóxicos e sem deixar resíduos que possam gerar resistências e/ou contaminarem o meio ambiente (BERGER, 2000).

## 2. Probióticos

### 2.1. Definição

Elie Metchnikoff é considerado o primeiro pesquisador a trabalhar com o conceito de probióticos (FULLER, 1992). Ele descreveu os probióticos como “micróbios ingeridos com o objetivo de promover a boa saúde”. Esta mesma definição foi modificada para “organismos e substâncias que contribuem ao balanço microbiano intestinal” (PARKER, 1974), e posteriormente por Fuller (1989) para “um suplemento alimentício microbiano que afeta benéficamente o animal hospedeiro melhorando seu balanço microbiano intestinal”.

Estas definições foram aplicadas originalmente para animais terrestres. Porém para a aquicultura esta definição pode ser insuficiente, pois em ambientes aquáticos há uma constante e maior interação entre os organismos cultivados e os micro-organismos presentes no ambiente. Tendo isso em conta, Gatesoupe (1999) define os probióticos para aquicultura como “células microbianas que são subministradas de tal maneira que entrem no trato gastrointestinal e que sejam capazes de manterem-se vivas, melhorando a saúde dos animais”.

Igualmente, Gram et al. (1999) ampliaram a definição eliminando a restrição a melhora apenas do intestino: “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro melhorando seu balanço microbiano”. E posteriormente, a FAO/WHO (2001) define os probióticos como “micro-organismos vivos que ao serem subministrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para à saúde do hospedeiro”.

Segundo Fuller (1989), estes micro-organismos vivos devem cumprir algumas características essenciais para serem utilizados como probióticos: 1) Ser efetivos na melhora da saúde do hospedeiro, 2) Não serem tóxicos ou patogênicos, 3) Devem ser viáveis e capazes de sobreviver ao metabolismo digestivo, 4) Serem capazes de colonizar o epitélio intestinal e de se manterem estáveis por um período longo de tempo e 5) Possuírem estabilidade em condições de armazenamento e de campo.

### 2.2. Mecanismo de ação dos probióticos

Existem várias teorias que explicam o modo de atuação dos probióticos no equilíbrio da microbiota intestinal, na melhora da digestão de nutrientes e na estimulação do sistema imune.

### 2.2.1. *Equilíbrio da microbiota intestinal*

A flora bacteriana do trato intestinal é um recurso natural completo que pode ser utilizado em um esforço para reduzir o impacto de bactérias patogênicas nos cultivos (CALLAWAY et al., 2008). Em animais aquáticos a microbiota intestinal está composta principalmente por bactérias gram negativas como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* ou *Plesiomonas*, dependendo das condições do meio aquático (MORIARTY, 1999; PRIEUR et al., 1990; SAKATA, 1990). No entanto estas bactérias podem ser patogênicas em condições de estresse, tanto em peixes como em camarões.

Os probióticos têm demonstrado ter a capacidade de reduzir populações de bactérias patogênicas modificando a microbiota intestinal, permitindo a colonização de bactérias benéficas e conseqüentemente melhorando a saúde do hospedeiro (RINGO; GATESOUBE, 1998).

As bactérias benéficas podem competir por nutrientes e/ou espaço e são capazes de produzir diferentes compostos inibitórios, servindo como antagonistas de bactérias patogênicas (FULLER, 1989). Esta capacidade de antagonismo é uma das principais propriedades a levar em consideração na hora de escolher um probiótico (FULLER et al., 1992; VERSCHUERE et al., 2000; FARZANFAR, 2006).

Estudos já demonstraram a capacidade *in vitro* de inibição de vários probióticos frente a diferentes patógenos (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2010; LIU et al., 2014; FHELLJEIM et al., 2010; MUÑOZ-ATIENZA et al., 2013; ZAPATA; LARA-FLORES, 2013). Esta capacidade inibitória é devida à produção de compostos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, sideróforos e /ou bacteriocinas (SUGITA et al., 1998; VERSCHUERE et al., 2000; VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003; VÁZQUEZ et al., 2005; PATEL et al., 2009; DOBSON et al., 2012).

Como exemplos, podemos citar o estudo realizado por Vásquez, Gonzalez e Murado (2005) onde demonstraram que o poder de inibição de bactérias ácido lácticas utilizadas como probióticos contra patógenos de peixes é principalmente devido à produção de ácido láctico e acético. Por outro lado, Smith e Davey (1993) relatam que *Pseudomonas fluorescence* é capaz de inibir o crescimento do patógeno *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum* por competição por ferro (GRAM et al., 1999).

Além da produção de compostos inibitórios e da competição por nutrientes, os probióticos podem competir por lugares de adesão aos

locais de fixação por forças passivas, por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e estéricas, ácidos lipoteicóicos e por estruturas específicas de adesão (SALYERS; WHITE, 2002). A capacidade de adesão de alguns probióticos já tem sido comprovada em vários estudos. Balcázar et al. (2007a) demonstraram que bactérias ácido lácticas usadas como probióticos diminuíram a adesão de bactérias patogênicas na mucosa intestinal da truta. Vine et al. (2004) também demonstraram que uma bactéria probiótica isolada do peixe palhaço (*Amphiprion percula*) foi capaz de se aderir na mucosa intestinal do peixe diminuindo a adesão do patógeno *V. alginolyticus*.

Assim, a adesão e colonização das superfícies mucosas junto com a produção de compostos inibitórios são possíveis mecanismos contra patógenos através de uma concorrência por sítios de ligação e nutrientes.

### **2.2.2. Melhora da digestão de nutrientes**

Os probióticos também podem auxiliar na digestão, ajudando o hospedeiro na absorção ou produção de nutrientes. Após se aderir no trato intestinal o probiótico precisará de carboidratos para seu crescimento e começará a produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, amilases e carboidrases as quais podem participar na digestão de nutrientes de peixes e camarões (OCHOA; OLMOS, 2006; ZIAEI-NEJAD et al., 2006; WANG et al., 2007).

Esta produção enzimática pode aumentar a digestibilidade de ingredientes e também ajudar na pré-digestão de nutrientes de origem vegetal presentes na ração (LARA-FLOREZ et al., 2003), melhorando parâmetros zootécnicos, como crescimento e eficiência alimentar. Igualmente probióticos são capazes de produzir vitaminas, como a B12, demonstrado em um estudo realizado com bactérias isoladas da microbiota de carpa, catfish e algumas espécies de tilápias (SUGITA et al.1990; SUGITA et al.1991).

No mesmo tempo, a estimulação da atividade enzimática por probióticos em camarões também já foi relatada por Wang et al. (2007). Eles comprovaram que o probiótico *Bacillus* sp. melhorou o crescimento e a atividade enzimática em *L. vannamei*, e recomendaram o uso deste probiótico para estimular a produção no cultivo. Resultados similares foram obtidos no *Fenneropenaeus indicus*, onde a adição de probiótico aumentou a atividade de amilases, lipases e proteases, resultando em um maior ganho de peso da pós-larva no final do experimento (ZIAEI-NEJAD et al. 2006).



Igualmente, uma pesquisa com *L. vannamei* evidenciou uma maior atividade de amilases quando os camarões foram alimentados com o probiótico *Bacillus* sp. (YU et al., 2009). Outro estudo sugere que o uso de probióticos com larvas *L. vannamei* adicionados na água em certas concentrações, pode aumentar a atividade de algumas enzimas e incrementar a sobrevivência (ZHOU, WANG, LI; 2009). Portanto, a modificação da microbiota intestinal por bactérias probióticas pode ser uma fonte suplementar de alimento disponibilizando vitaminas e aminoácidos.

### 2.2.3. Estimulação do sistema imune

A microbiota normal do trato intestinal influencia no sistema imune do organismo formando parte de uma rede de proteção imunológica e não imunológica, conferindo proteção contra patógenos ou tolerância contra bactérias comensais presentes no epitélio (SANZ; PALMA, 2009). Deste modo, ao colonizar o trato intestinal, os probióticos não só inibem patógenos como também são capazes de estimular o sistema imunológico do hospedeiro por possuírem em suas paredes celulares lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e  $\beta$ -glucanos atuando como moléculas sinalizadoras para ativar o sistema imune (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2014; AKHTER et al., 2015).

O sistema imunológico de peixes e vertebrados superiores está dividido em duas respostas de defesa: 1) a resposta inata ou não específica que compreende reações celulares e humorais e 2) a resposta adquirida ou específica caracterizada por respostas humorais através da produção de anticorpos e por respostas celulares mediadas por linfócitos T que reagem de forma específica com antígenos (TORT; BALASCH; MACKENZIE, 2003).

Os probióticos têm demonstrado ter uma atividade imunoestimulante e imunomoduladora em peixes. Em tilápia, por exemplo, *L. plantarum* e *Bacillus subtilis* além de possuir capacidade inibitória frente à *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus iniae*, aumentaram os valores de hematócritos, a aderência de neutrófilos, atividade da lisozima e a atividade bactericida do soro (ALY, et al., 2008). Em truta, a adição de *Lactobacillus rhamnosus* na dieta aumentou a atividade da lisozima e a atividade fagocítica dos leucócitos indicando que o probiótico possa ter uma função imuno-reguladora (PANIGRAHI et al., 2004). Adicionalmente, resultados similares têm sido obtidos por Sharifuzzaman e Austin (2009) onde trutas alimentadas

com probiótico aumentaram a resposta imune e humoral após infecção com *V. anguillarum*.

Já os camarões como invertebrados, carecem de um sistema imune específico. Portanto, seu sistema de defesa está baseado em um sistema imune inato para reconhecer os patógenos invasores. O sistema imunológico dos crustáceos está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa e às células circulantes, hemócitos (BARRACO et al., 2008) . Os hemócitos além de estarem envolvidos na fagocitose, também são responsáveis pela produção de melanina via sistema pró-fenoloxidase que é um importante componente na reação da defesa celular (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989).

A estimulação do sistema imune em camarões por bactérias probióticas também tem sido relatada por vários autores. Chiu et al. (2007) sugerem que *L. plantarum*, usado como probiótico na dieta é capaz de induzir a modulação do sistema imune de *L. vannamei* após infecção com *V. alginolyticus*, aumentando sua resistência. Resultados similares obtidos por Rodríguez et al. (2007) demonstram que o uso de probiótico teve um resultado positivo, aumentando a atividade antibacteriana do soro de camarões *L. vannamei*. Balcázar et al. (2003) além de obterem um aumento da atividade antibacteriana do soro também obtiveram um aumento da fagocitose em camarões suplementados com um mix de probióticos. Adicionalmente, camarões que receberam *Streptococcus phocae* como probiótico tiveram maiores contagens de hemócitos totais, maior atividade da enzima fenoloxidase (PO) e maior atividade fagocítica (PATTUKUMAR et al., 2014).

### **2.3. Bactérias usadas como probióticos e seus efeitos na aquicultura**

Existe uma grande variedade de probióticos usados tanto no cultivo de peixes como de camarões. As bactérias utilizadas comumente na aquicultura podem ser bactérias gram negativas ou gram positivas.

#### **2.3.1. Bactérias Gram negativas**

Dentro do grupo das bactérias gram negativas utilizadas como probióticos, as bactérias mais comuns pertencem aos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Vibrios*. O gênero *Aeromonas* possui capacidade inibitória *in vitro* por produção de bacteriocinas frente a vários patógenos de importância na aquicultura (GIBSON; WOODWORTH; GEORGE, 1998).

Vários estudos também têm confirmado esta mesma capacidade inibitória *in vivo* em trutas, onde suplementação com *Aeromonas* aumentou sua resistência frente à infecção com *Yersinia ruckeri* (ABBAS et al., 2010) e estimulou o sistema imune, aumentando sua resistência frente à infecção com *A. salmonicida* (IRIANTO;AUSTIN, 2002). Igualmente, *A. hydrophyla* fornecidas na água de cultivo ajudou a aumentar as sobrevivências totais no cultivo de *Artemia franciscana* (GUNASEKARA et al., 2010).

Cepas de *Pseudomonas* também são usadas como probióticos na aquicultura. Um estudo relatou a capacidade de inibição de *Pseudomonas marina* pela produção de substâncias inibitórias sobre vibriões patogênicos de camarão como *Vibrio harveyi*, *Vibrio fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio damsela* e *Vibrio vulnificus* (CHYTHANYA; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR, 2002). Outras cepas de *Pseudomonas* isoladas do trato intestinal de trutas também demonstraram eficiência inibindo *Flavobacterium psychrophilum* em condições *in vitro* (STRÖM-BESTOR; WIKLUND, 2011). Em condições *in vivo*, Giri et al. (2012) também relataram melhores resultados ao usar *P. aeruginosa* em *Labeo rohita* conferindo resistência imune após desafio com *A. hydrophila*. Em camarões, o uso de *Pseudomonas* sp. também aumentaram a sobrevivência de *Penaeus monodon* ao serem infectados *V. harveyi* (PAI et al., 2010)

Por outro lado, no Equador, o *V. alginolyticus* ao ser utilizado como probiótico, incrementou o crescimento e sobrevivência de *L. vannamei*, sugerindo uma exclusão competitiva do probiótico frente a bactérias patogênicas do sistema de cultivo (GARRIQUES; AREVALO, 1995). Resultados semelhantes foram obtidos por Balcázar et al. (2007b) usando *V. alginolyticus* para aumentar a resistência de *L. vannamei* frente a *V. parahaemolyticus*.

No cultivo de *Macrobrachium rosenbergii*, uma cepa de vibrio isolada influenciou positivamente na sobrevivência, crescimento e nos parâmetros imunológicos (RAHIMAN et al., 2010), e em *L. vannamei* o uso de *Vibrio* spp. reduziu vibriões patogênicos, melhorando a saúde do camarão (THOMPSON et al., 2010). Não obstante, segundo Kesacordi-Watson et al. (2012), o uso de bactérias gram negativas está sujeito ao risco de transferência de material genético causando resistências ou virulências.

### 2.3.2. *Bactérias Gram positivas*

O grupo dominante das bactérias gram positivas utilizadas como probióticos é a das que pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas e ao gênero *Bacillus* (BALCÁZAR et al., 2006; DECAMP; MORIARTY; LAAVENS, 2008). As bactérias do gênero *Bacillus* se caracterizam por produzir endósporos em situações adversas no meio ambiente o que lhes confere uma vantagem de apresentar maior viabilidade ao longo do tempo.

Diversas espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas como probióticos, como *B. subtilis*, *Bacillus. clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus coagulans* (CUTTING, 2011). Estas bactérias são capazes de produzir diferentes metabólitos secundários como antibióticos e enzimas, inibindo patógenos e auxiliando na digestão de nutrientes.

Como exemplo, Ochoa-Solano e Olmos-Sotos (2006) demonstraram a capacidade *in vitro* de várias cepas provenientes de sedimentos marinhos, para degradar proteínas e outros compostos derivados da soja, como também a capacidade de produzir enzimas que degradam carboidratos e lipídeos. Por outro lado, cepas de *Bacillus* isoladas de cultivo de camarão foram capazes de inibir *in vitro* *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, como também tiveram a capacidade de reduzir as populações de *Vibrio* spp. no sistema de cultivo obtendo uma melhor resposta hemato-imunológica do camarão (VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003; FERREIRA et al., 2015). Adicionalmente, alguns autores relatam que *Bacillus* é capaz de melhorar a qualidade da água de cultivo ajudando na degradação da matéria orgânica do sistema (VERSCHUERE et al., 2000; SONG et al., 2011).

Na aquicultura, espécies de *Bacillus* são bastante utilizadas em formulações comerciais de rações pela capacidade de produzir compostos inibitórios e enzimas, e pela facilidade de incorporação nas rações devido a seus esporos lhes conferir maior resistência. Contudo, Wang et al. (2000) encontraram que *B. subtilis* foi responsável por causar lesões na cutícula de *P. monodon*.

Em outro estudo mais recente realizado por Velmurugan et al. (2015) descrevem uma nova enfermidade chamada WPD (do inglês, *White Patch Disease*) causada por *B. cereus* em *L. vannamei* causando como principais sintomas manchas brancas opacas na carapaça, necrose, coloração azul esbranquiçada, perda de apetite, músculos pálidos e mortalidades.

As bactérias ácido-lácticas constituem um grupo de bactérias gram positivas, catalase-negativa, não esporuladas, em forma de cocos ou bacilos e produzem ácido láctico como principal produto final durante a fermentação de carboidratos. São de hábitat anaeróbico, mas podem ser aeróbias facultativas e ácido tolerantes. Geralmente estão associadas com habitats ricos em nutrientes. No entanto, podem estar presentes na flora nativa da boca, intestino e trato urinário de mamíferos. As delimitações do grupo tem sido assunto de algumas controvérsias, contudo os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* formam parte deste grupo (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros está baseada em grande medida na morfologia, no modo de fermentação da glicose, no crescimento a diferentes temperaturas, na configuração do ácido láctico produzido, na habilidade para crescer em altas salinidades, e na sua tolerância à acidez ou alcalinidade (SALMINEM et al., 1993).

As bactérias ácido-lácticas além de produzirem diferentes compostos antimicrobianos, também se caracterizam por serem de fácil multiplicação e por estimularem a resposta imune não específica do hospedeiro (GATESOUBE, 2008), desempenhando assim um papel importante no controle de enfermidades.

Em alguns peixes, estudos têm associado às bactérias ácido-lácticas como parte da sua microbiota normal (LARA-FLORES, 2003; BALCÁZAR et al., 2008), como também com a inibição do crescimento de bactérias patogênicas (ESCOBAR-BRIONES; OLVERA-NOVOA; PUERTO-CASTILLO, 2006; ZAPATA; LARA-FLORES, 2013;), como promotoras de crescimento (LARA-FLORES et al., 2003; EL-HAROUN et al., 2006; APÚN-MOLINA et al., 2009) e no aumento da sobrevivência em infecções experimentais, melhorando a resposta imunológica (PIRARAT et al., 2006; ALY et al., 2008).

Por outro lado, as bactérias ácido-lácticas apesar de não serem dominantes na microbiota intestinal de camarões, quando adicionadas na dieta podem incrementar sua população, como tem sido demonstrado por vários autores (VIEIRA et al., 2010; KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; BOLÍVAR-RAMÍREZ et al., 2013). Camarões *L. stylirostris* tratados com *Pediococcus acidilactici* alcançaram maiores sobrevivências em relação ao controle, e apresentaram uma menor prevalência de *V. nigripulchritudo* (CASTEX et al., 2010). O *L. plantarum* também demonstrou ser benéfico para o *L. vannamei* aumentando a resposta imune humoral e celular após desafio

com *V. alginolyticus* (CHIU et al., 2007) e após infecção com *V. harveyi* (VIEIRA et al., 2007, 2010).

### 3. Ácidos orgânicos e seus sais

Como alternativa adicional ao uso de antibióticos, Vásquez, González e Murado (2005) propuseram o uso de ácidos orgânicos como aditivos na alimentação de peixes, demonstrando que bactérias lácticas inibiram as bactérias patogênicas da microbiota de *Scophthalmus maximus* devido à produção de ácido láctico e ácido acético sem a produção de bacteriocinas. Estes ácidos orgânicos têm recebido grande atenção como substituintes potenciais dos antibióticos no intuito de melhorar o desempenho e à saúde animal (LÜCKSTÄDT, 2008).

Os ácidos orgânicos são considerados como compostos GRAS (do inglês, Generally Regarded as Safe) com um ou mais grupos carboxílicos (-COOH) com capacidade antimicrobiana (DEIFORDT et al., 2009). Muitos dos ácidos orgânicos estão também disponíveis em sais de sódio, potássio e cálcio o que lhes confere vantagens como ser inodoros, de fácil manipulação durante a adição na ração devido a sua solidez e pouca volatilização, menos corrosivos e mais solúveis em água que os ácidos livres (PARTANEN; MROZ, 1999).

#### 3.1. Mecanismos de ação e os efeitos dos sais orgânicos e seus na aquicultura

##### 3.1.1. Inibição de bactérias patogênicas

Os ácidos orgânicos e seus sais são eficazes na inibição bactérias patogênicas, principalmente gram negativas, ao diminuir o pH do seu entorno. Estes ácidos entram na parede celular e liberam prótons no citoplasma desequilibrando o pH da célula. Para manter o equilíbrio, a bactéria começa a consumir grandes quantidades de ATP para expulsar os prótons para fora da célula. O alto gasto de ATP causa uma depleção energética que termina com a morte celular (LÜCKSTÄDT, 2008).

Alguns ácidos orgânicos ou seus sais já demonstraram seu poder inibitório *in vitro* frente a diferentes espécies de *Vibrio*. Silva et al. (2013) verificaram que o fumarato, acetato, butirato e propionato de sódio foram capazes de inibir *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *V. harveyi*. Estudos similares também demonstraram a capacidade inibitória de ácidos orgânicos como o ácido fórmico, acético, butírico, propiônico e valérico frente a diferentes espécies de *Vibrio* patogênicos

em crustáceos (DEFOIRDT et al., 2006; MINE; BOOPATHY, 2011; ADAMS; BOOPATHY, 2013).

Além de diminuir o pH intracelular, os ácidos orgânicos e seus sais são capazes de formar complexos quelantes com minerais, principalmente com o ferro, indisponibilizando micronutrientes e limitando o crescimento de outros micro-organismos (JONES, 1998; CARDOSO; NOGUEIRA, 2007).

### **3.1.2. Melhora na digestão de nutrientes**

Estudos têm comprovado que o uso de ácidos orgânicos aumenta a absorção do fósforo em animais ao diminuir o pH solubilizando substâncias antinutricionais presentes na ração, como fosfato tricálcico e fitatos. Adicionalmente, os ácidos orgânicos são capazes de disponibilizar os minerais das dietas baixando o pH, resultando em uma maior dissociação dos compostos minerais, reduzindo a taxa de esvaziamento do estômago, e formando complexos minerais quelatos, que são facilmente absorvidos no intestino (HOSSAIN; PANDEY; SATOH, 2007; LUCKSTADT, 2008).

Em *Pagrus major*, por exemplo, o uso de ácidos orgânicos como o ácido cítrico aumentou a retenção de fósforo e nitrogênio, evitando a necessidade de adição de fósforo inorgânico, conseqüentemente, diminuindo resíduos no cultivo (SARKER; SATOH; KIRON, 2005). Igualmente, em *L. rohita*, o uso de ácidos orgânicos incrementou a biodisponibilidade de minerais como K, P, Ca, Mg, entre outros (BARUAH et al., 2007).

Outro estudo realizado em trutas, ficou demonstrado que o uso de sais orgânicos como o formiato de sódio melhorou a digestibilidade de lipídeos, cinzas e proteínas, e todos os aminoácidos essenciais e não essenciais (MORKEN et al., 2011). No camarão marinho *L. vannamei*, sais como o butirato e o propionato de sódio ajudaram a incrementar a retenção de nitrogênio e a taxa de eficiência proteica (SILVA et al., 2014) e na digestibilidade aparente de energia e fósforo (SILVA et al., 2013).

Os ácidos orgânicos e seus sais também são fontes de energia podendo ser usados em várias rotas metabólicas energéticas como o ciclo de Krebs, como também podem influenciar enzimas como a pepsina, a qual possui melhor atividade a pH baixos (LUCKSTADT, 2008). Igualmente um estudo realizado por Silva et al. (2015) relatam que o uso de acetato e propionato de sódio incrementaram a atividade da

tripsina e quimiotripsina em ensaios com *L. vannamei* e uma maior digestibilidade de proteína *in vitro* com fumarato e succinato de sódio.

### 3.1.3. *Melhora nos índices zootécnicos*

Diversos estudos já comprovaram que a inclusão de ácidos ou sais orgânicos em dietas melhoram diversos parâmetros zootécnicos de aves e suínos (IBA; BERCHIERI, 1995; FRANCO et al., 2005). Da mesma forma, na aquicultura, o uso de ácidos e sais orgânicos melhoraram diferentes parâmetros zootécnicos como ganho de peso, eficiência alimentar, sobrevivência, parâmetros imunológicos, microbiota intestinal e resistência frente a desafio com diferentes patógenos.

O uso de diferentes ácidos orgânicos ou seus sais ajudaram a obter um maior ganho de peso em *Sciaenops ocellatus* (CASTILLO et al. 2014). Em *L. vannamei* aumentaram o ganho de peso e melhoraram a sobrevivência e a eficiência alimentar com menores concentrações de bactérias patogênicas (*Vibrio* spp.) no intestino (SILVA et al. 2013, 2014). Resultados similares foram obtidos no intestino de tilápias híbridas onde o uso de ácidos orgânicos diminuiu as concentrações de *A. hydrophila* no intestino, (NG et al., 2009) e em *Dicentrarchus labrax* onde o uso de o poly- $\beta$ -hydroxy butyrate (PHB) foi capaz de alterar a microbiota intestinal dos peixes aumentando o ganho de peso (DE SCHRYVER et al., 2010).

Em *P. monodon* ácidos orgânicos além de diminuir concentrações de *Vibrios* spp. no hepatopâncreas e intestino, conferiram maior resistência aos camarões frente à infecção com *V. harveyi*, aumentando a atividade imune e reduzindo lesões no hepatopâncreas (NG et al., 2015; ROMANO; KOH; NG, 2015). Em *L. vannamei* o uso do diformiato de potássio (KDF) aumentou o crescimento e produtividade final em 19.5% (KÜHLMANN; JINTASATAPORN; LÜCKSTÄDTS, 2011a). A diminuição da mortalidade em camarões infectados por *V. harveyi*, sugeriu que este ácido também possui o mesmo efeito em outras bactérias gram negativas patogênicas no cultivo de *L. vannamei* (KÜHLMANN; JINTASATAPORN; LÜCKSTÄDTS, 2011b). Adicionalmente, *L. vannamei* alimentados com ácido cítrico tiveram uma melhor resposta imunológica e uma melhor resistência frente à infecção com *V. alginolyticus* (SU et al., 2014).



#### **4. Uso em conjunto de sais orgânicos e probióticos na produção animal**

Os probióticos e os ácidos orgânicos possuem efeitos positivos no desempenho animal, contudo poucos trabalhos têm sido publicados avaliando seu uso em conjunto. Em aves, foi testado o *Lactobacillus* sp. como probiótico em conjunto com uma mistura de ácidos orgânicos contra infecção com *Salmonella enteritidis*. As aves alimentadas com ácidos orgânicos e probióticos apresentaram menor concentração do patógeno que os tratamentos individuais (WOLFENDEN et al., 2007). Kung et al. (2004) sugerem que o uso de ácidos orgânicos, como o propiônico junto com inoculações de bactérias produtoras de ácido láctico resulta em uma combinação positiva no próprio inóculo bacteriano melhorando processos de fermentação.

Já para aquicultura não foram encontrados trabalhos publicados com uso combinado de ácidos orgânicos (ou seus sais) e probióticos. Contudo, um trabalho realizado por Kühlmann, Jintasataporn e Lückstädts (2011b), sugere que o uso de ácidos orgânicos no camarão poderia beneficiar a ação probiótica de bactérias como *Lactobacillus* sp., melhorando a saúde do animal. Adicionalmente, alguns sais orgânicos formam parte dos requerimentos nutricionais das bactérias ácido lácticas (DEFOIRDT et al., 2009) o que pode resultar em um aumento da sua concentração melhorando o efeito inibitório.

#### **5. JUSTIFICATIVA**

O mau uso dos antibióticos na aquicultura levou ao aparecimento de bactérias resistentes e por isto há uma necessidade de buscar métodos alternativos para combater as doenças bacterianas. Dentro desses métodos destacam-se os preventivos como o uso de probióticos e de ácidos orgânicos e seus sais.

Probióticos já são amplamente conhecidos tanto em humanos e animais terrestres como na aquicultura por gerar efeitos positivos na saúde do hospedeiro. Igualmente, ácidos orgânicos e seus sais têm sido usados em aves e suínos, obtendo melhorias no desempenho zootécnico dos animais. Na aquicultura estes aditivos têm sido usados em algumas espécies de peixe e crustáceos, melhorando seu crescimento, digestibilidade de nutrientes e sobrevivência. Porém, trabalhos com ácidos orgânicos em camarões marinhos são escassos.

O uso de probióticos e ácidos orgânicos e seus sais tem grande potencial para uso na aquicultura. Deste modo, estes sais poderiam ser utilizados em conjunto com bactérias ácido lácticas, melhorando a colonização e efeitos benéficos do uso de probióticos na saúde e

nutrição dos animais. Assim, estes resultados poderiam ser de grande benefício onde a busca de melhoras na tecnologia para manejo da dieta, qualidade de água e controle de enfermidades, é cada vez mais elevada.

Contudo, nenhum trabalho foi encontrado avaliando o uso de dieta suplementada com probióticos e sais orgânicos em camarões marinhos, destacando o caráter de ineditismo deste projeto.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. *Objetivo geral*

Desenvolver um pacote tecnológico para uso conjunto de probióticos e sais orgânicos no cultivo de camarão marinho *L. vannamei*.

### 6.2. *Objetivos específicos*

a) Determinar o efeito *in vitro* de oito sais orgânicos no crescimento de *L. plantarum*,

b) determinar a inibição *in vitro* dos oito sais orgânicos isolados e em combinação com o probiótico frente a cinco patógenos diferentes,

c) avaliar a microbiota bacteriana intestinal, parâmetros zootécnicos e parâmetros imunológicos em camarões alimentados com sal orgânico, com probiótico e com sua combinação na engorda em água clara,

d) avaliar a sobrevivência e parâmetros imunológicos de *L. vannamei* alimentados com o sal orgânico, com o probiótico e com sua combinação, após infecção com *V. alginolyticus*.

## 7. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese é dividida em três capítulos: o primeiro referente à introdução geral e revisão de literatura; o segundo capítulo é um artigo original formatado segundo normas da revista *Aquaculture Research* (B2, fator de impacto 1,376) e o terceiro artigo é um artigo original formatado segundo normas ABNT.



## 8. CAPÍTULO II: A combinação de probióticos e sais orgânicos apresentam uma melhor inibição *in vitro* contra bactérias patogênicas da aquicultura

### Resumo

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito *in vitro* de sais orgânicos sobre o crescimento do probiótico *Lactobacillus plantarum* e o uso combinado de sais orgânicos e de probiótico sobre a inibição *in vitro* de *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus agalactiae*. Testes *in vitro* foram realizados com oito diferentes sais orgânicos (butirato, propionato, succinato, citrato, formiato fumarato, glutamato e acetato de sódio) em dois valores de pH (6,2 e 7,1) para determinar os seus efeitos sobre a cinética de crescimento de *L. plantarum*. Além disso, cada sal orgânico foi testado isoladamente e em combinação com *L. plantarum* para avaliar o seu efeito inibitório contra as bactérias patogênicas. Os resultados mostram que formiato e citrato de sódio inibiram o crescimento de *L. plantarum*, enquanto que o butirato, propionato e acetato de sódio não influenciaram no crescimento do probiótico. A inibição contra todos os patógenos foram significativamente maiores na presença do probiótico e em pH mais baixo. Em ambos os valores de pH (6.2 e 7.1), butirato, acetato e propionato tiveram a maior inibição contra *V. alginolyticus*, o propionato contra *A. hidrophyla*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e o fumarato contra *S. agalactiae*. Podemos concluir do presente trabalho que os sais orgânicos têm maior inibição *in vitro* em conjunto com o probiótico frente a diferentes patógenos da aquicultura.

Palavras chaves: *L. plantarum*, propionato de sódio, butirato de sódio, bactérias patogênicas, enfermidades.

## 9. Introdução

Produção de aquicultura mundial cresceu progressivamente nas últimas décadas, com um aumento na taxa média anual de 3,2%, atingindo a produção de 97,2 milhões de toneladas em 2013 (FAO 2015), e pela primeira vez, a produção aquícola ultrapassou a captura (93,7 milhões de toneladas). Sistemas de produção intensiva, poluição e desequilíbrios ecológicos e nutricionais levaram ao surgimento de várias doenças na produção aquícola, (Lightner, 2011). De acordo com a FAO (2014), a produção de aquicultura foi extremamente afetada como

resultado do surgimento de várias doenças, particularmente aquelas causadas por vírus e bactérias, levando a perdas significativas em peixes, camarões, moluscos e equinodermos. A exemplo da síndrome de mortalidade precoce (EMS), causado por uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* que provocou a redução nos volumes de produção de camarões em 2012 e mais significativamente em 2013 em alguns países asiáticos e latino-americanos (Lightner et al., 2012; Tran et al., 2013). Os efeitos negativos das infecções causadas por bactérias podem causar vários sintomas como anorexia, inatividade, taxa de crescimento baixa, necrose muscular e conseqüentemente, mortalidades (Lafferty et al., 2015).

Os antibióticos são normalmente usados para o tratamento de doenças bacterianas. Embora alguns destes produtos possam reduzir as taxas de mortalidade, sua má utilização na aquicultura conduz ao aparecimento de bactérias resistentes (Deifordt et al., 2011). Além disso, há uma preocupação com o possível impacto de seus resíduos químicos na saúde humana e no meio ambiente (Graslund et al., 2003), levando a União Europeia a proibição do uso de antibióticos na produção animal sendo esta uma tendência global. Portanto, alternativas aos antibióticos na produção animal estão sendo testadas no mundo inteiro, tais como os probióticos e, mais recentemente, sais orgânicos.

O interesse no uso de probióticos baseia-se na sua capacidade de inibir as bactérias patogênicas e na sua capacidade para estimular o sistema imunológico do hospedeiro sem causar resistência ou deixar resíduos, diferentemente do que acontece com os antibióticos (Castex et al., 2010).

Entre as bactérias probióticas utilizadas na aquicultura, destacam-se as bactérias ácido-lácticas devido a que possuem fácil multiplicação, produzem compostos antimicrobianos (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e ácido láctico) e estimulam a resposta imune não-específica do hospedeiro (Gatesoupe, 2008).

Por outro lado, ácidos orgânicos são eficientes na inibição de bactérias patogênicas, particularmente bactérias Gram-negativas, por meio da redução do pH do seu meio ambiente. Os ácidos orgânicos penetram na parede celular e liberam prótons no citoplasma. Conseqüentemente ocorre um desequilíbrio no pH intracelular e a célula começa a gastar ATP para expulsar os prótons e finalmente a célula morre por depleção energética. Os sais orgânicos além de reduzir o pH intracelular, são capazes de formar complexos quelantes com minerais, tornando-os indisponíveis limitando o crescimento de outros microorganismos (Jones 1998). Deste modo, eles têm sido avaliados como

uma possível alternativa para a substituição do uso de antibióticos, com o objetivo de melhorar a saúde e o desempenho animal (Lückstädt, 2008). Muitos ácidos orgânicos estão disponíveis na forma de sais, tais como sais de sódio, potássio e cálcio com a vantagem de serem menos corrosivos e apresentar melhor solubilidade na água (Partanen e Mroz 1999).

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito *in vitro* de sais orgânicos (butirato, propionato, fumarato, glutamato, acetato, succinato, formiato e citrato) sobre o crescimento do probiótico *L. plantarum* e o uso combinado de sais orgânicos e probióticos na inibição *in vitro* de *V. alginolyticus*, *A. hydrophyla*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. agalactiae*.

## **10. Material e métodos**

Os experimentos foram executados no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, no sul do Brasil.

### **10.1. Material biológico e sais orgânicos**

A cepa bacteriana usada como probiótico foi *L. plantarum*, isolada de intestino de adultos de *L. vannamei* (Vieira et al., 2007) e mantida na coleção de microrganismos do setor de Microbiologia do LCM/UFSC.

Avaliaram-se oito diferentes sais orgânicos: butirato de sódio ( $C_3H_7COONa$ ), propionato de sódio ( $C_3H_5NaO_2$ ), acetato de sódio ( $C_2H_3NaO_2$ ), citrato de sódio ( $Na_3C_6H_5O_7$ ), glutamato de sódio ( $C_5H_8NO_4Na$ ), succinato de sódio ( $C_4H_4Na_2O_4$ ), fumarato de sódio ( $C_4H_2Na_2O_4$ ) e formiato de sódio ( $HCOONa$ ).

Foram testadas cinco bactérias patogênicas diferentes: *V. alginolyticus*, *A. hydrophyla*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. agalactiae*.

### **10.2. Efeito *in vitro* de sais orgânicos sobre o crescimento da bactéria probiótica *L. plantarum***

Cada sal orgânico foi diluído a 5% em tubos de ensaio contendo meio de cultura caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe). Os sais orgânicos foram ajustados em dois valores de pH diferentes simulando o pH da ração de camarões (6.2) e o pH do intestino de *L. vannamei* (7.1) segundo metodologia descrita por Silva et al. (2013). Posteriormente, o probiótico *L. plantarum* foi semeado em cada tubo e seu crescimento foi determinado realizando leituras cada duas horas em leitora de microplaca fundo chato (Marca: ASYS, Modelo: Expert Plus) (DO 630)

para determinar cinética de crescimento durante 24 horas sendo calculada a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) (Eq. 1), tempo de duplicação ( $t_{dup}$ ) (Eq. 2) e concentração final da bactéria. As concentrações iniciais obtidas de cada sal orgânico estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1** Concentração em millimolar (mM) de cada sal orgânico diluído a 5% em caldo MRS

| Sal orgânico        | Concentração (mM) |
|---------------------|-------------------|
| Butirato de sódio   | 454               |
| Propionato de sódio | 520               |
| Acetato de sódio    | 609               |
| Citrato de sódio    | 193               |
| Glutamato de sódio  | 267               |
| Succinato de sódio  | 357               |
| Fumarato de sódio   | 312               |
| Formiato de sódio   | 735               |

Velocidade máxima:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(z) - \ln(Z_0)}{dt} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:  $\mu_{max}$  = velocidade máxima de crescimento

Z = concentração (UFC/mL)

Z<sub>0</sub> = concentração inicial do inóculo (UFC/mL)

dt = tempo de cultivo (horas)

Tempo de duplicação:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (\text{Eq. 2})$$

A concentração do probiótico foi determinada de acordo com a curva de crescimento realizada previamente em UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônias por mililitros). Para o controle foi utilizado



somente caldo MRS ajustando os dois pH, sem adição dos sais orgânicos.

### **10.3. Efeito *in vitro* de oito sais orgânicos e de *L. plantarum* frente a diferentes patógenos**

Foi comparado o efeito inibitório *in vitro* de *L. plantarum* e de cada sal orgânico (pH 6.2 e 7.1) isoladamente e em conjunto (probiótico + sal orgânico) frente a *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. agalactiae*. Nos testes com os sais orgânicos isolados, foram adicionados 100 µL de PB (do inglês “Poor Broth” 1% de peptona, 0,5% de NaCl, pH 7,4) em cada poço da microplaca de 96 poços de fundo chato e 100 µL de cada tubo de sal orgânico (5%) no primeiro poço. Posteriormente foi realizada uma diluição seriada fator dois até o 12º poço. Finalmente, foram adicionados em todos os poços 20µL da bactéria patogênica (mantida previamente em caldo PB a 28°C durante oito horas) em uma concentração ajustada de  $1 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> de acordo com a curva de crescimento realizada anteriormente. Os testes foram realizados para cada bactéria patogênica em triplicata.

Para os testes realizados junto com o probiótico, foi utilizado só o sobrenadante da bactéria para que as células não interferissem na leitura da absorbância. Para isto, o *L. plantarum* foi previamente semeado em caldo MRS a 36°C por 24 horas, centrifugado por 30 minutos a 4000 x g e seu sobrenadante filtrado em 0,22 µm. Posteriormente, 50µL de sobrenadante do probiótico mais 50 µL de sal orgânico (5% diluído em PB) foram adicionados no primeiro poço da microplaca (que contem 100 µL de PB previamente colocados em todos os poços), e em seguida foi realizada uma diluição seriada fator dois até o 12º poço. Igualmente, 20µL da bactéria patogênica foi adicionada a cada poço em uma concentração de  $1 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os testes foram realizados com cada bactéria patogênica. Para os controles nos testes sem probiótico foi utilizado somente caldo PB mais sal orgânico, adicionando-se ou não a bactéria patogênica (controle positivo e negativo, respectivamente). Para os controles nos testes com probiótico foi utilizado PB junto com os sais orgânicos e o sobrenadante adicionando-se ou não o patógeno (controle positivo e negativo, respectivamente). As microplacas foram incubadas a 28°C por 12 h e o crescimento dos micro-organismos determinado em leitora de microplaca (DO 630nm) e a concentração foi obtida de acordo com a curva de crescimento de cada bactéria patogênica previamente estabelecida.

#### **10.4. Análises estatísticas**

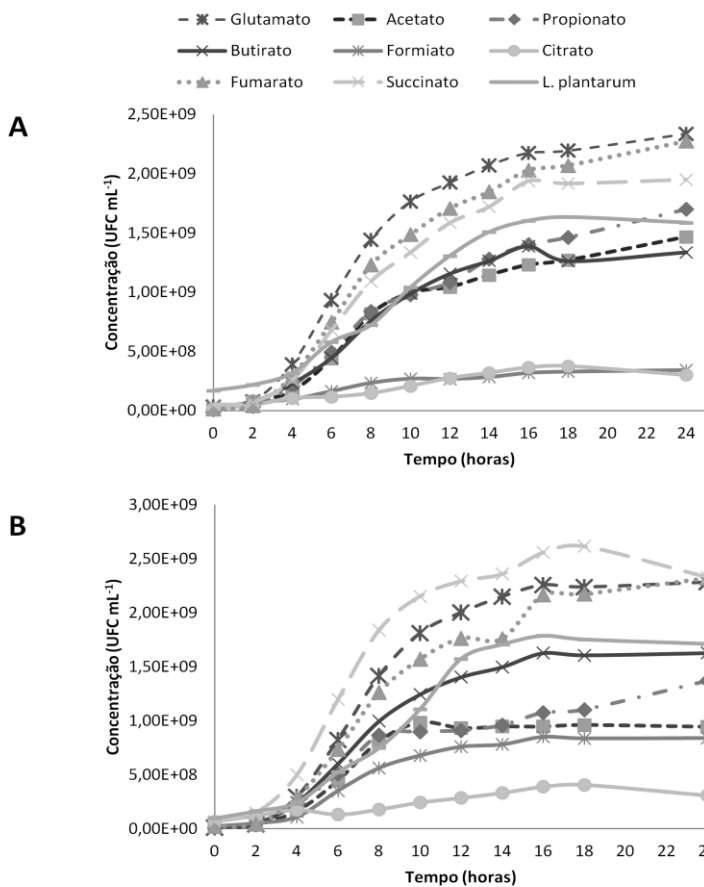
Os valores da cinética microbiana (tempo de duplicação da célula, velocidade máxima de crescimento e concentração) e a concentração inibitória mínima foram  $\log(x + 1)$  transformado para homogeneização de variância e normalização de dados. Homocedasticidade foi avaliada pelo teste de Bartlett. Cinética microbiana e a concentração mínima inibitória foram submetidas à análise fatorial de variância ( $\alpha < 0,05$ ). Em caso de diferenças significativas, foi utilizado o teste HSD de Tukey de separação de médias (Zar, 1984).

### **11. Resultados**

#### **11.1. Efeito *in vitro* de sais orgânicos sobre o crescimento da bactéria probiótica *L. plantarum***

A cinética de crescimento ilustrada na figura 1, mostram que o citrato e o formiato de sódio inibiram significativamente o crescimento do probiótico tanto em pH 6.2 como em pH 7.1. Em contraste, o succinato, fumarato e glutamato de sódio estimularam o crescimento de *L. plantarum* atingindo maiores concentrações durante toda a cinética de crescimento quando comparados com o controle (probiótico sem adicionar sal orgânico). O butirato, propionato e acetato de sódio apresentaram crescimentos similares em relação ao controle.

A velocidade máxima de crescimento, o tempo de duplicação e a concentração correspondente foram calculados a partir dos dados obtidos após 12 horas de crescimento (tempo médio de todos os tratamentos antes de iniciar a fase estacionária). As velocidades de crescimento e as concentrações do probiótico foram significativamente menores com o citrato e o formiato de sódio independentemente do pH aumentando consequentemente os tempos de duplicação comparados com o controle (Tabela 2).



**Figura 1** Cinética de crescimento de *L. plantarum* durante 24 horas, expressadas em unidades formadoras de colônias (CFU mL<sup>-1</sup>) com adição de sais orgânicos a pH 6.2 (A) e 7.1 (B).

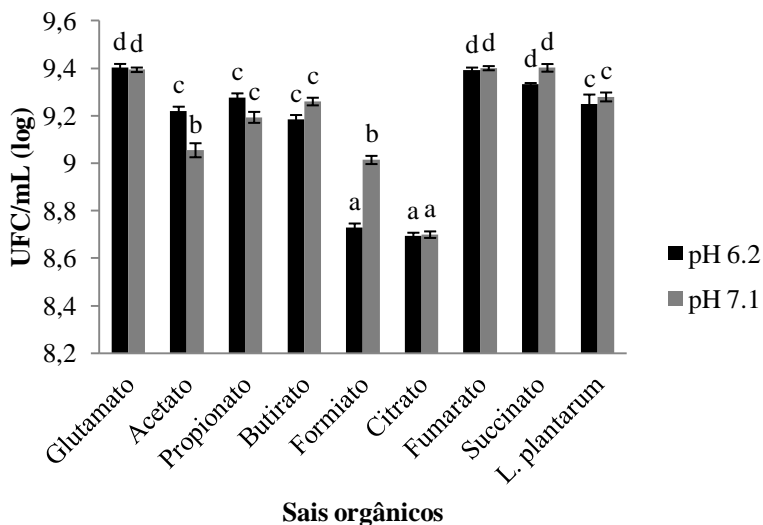
**Tabela 2** Concentração (C), velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e tempo de duplicação (tdup) de *L. plantarum* com diferentes sais orgânicos em dois valores de pH.

| <b>pH 6.2</b>   |   |                                |                        |
|-----------------|---|--------------------------------|------------------------|
|                 | <b>C (CFU mL<sup>-1</sup> x 10<sup>8</sup>)</b> | <b><math>\mu_{\max}</math></b> | <b>td</b>              |
| Glutamato       | 21,16±0,96 <sup>c</sup>                         | 0,34±0,00 <sup>c</sup>         | 2,06±0,02 <sup>a</sup> |
| Acetato         | 12,36±0,64 <sup>c</sup>                         | 0,29±0,00 <sup>c</sup>         | 2,37±0,04 <sup>a</sup> |
| Propionato      | 12,76±0,56 <sup>c</sup>                         | 0,30±0,00 <sup>c</sup>         | 2,35±0,03 <sup>a</sup> |
| Butirato        | 13,49±0,62 <sup>c</sup>                         | 0,30±0,00 <sup>c</sup>         | 2,31±0,03 <sup>a</sup> |
| Formiato        | 4,61±0,25 <sup>a</sup>                          | 0,21±0,00 <sup>a</sup>         | 3,30±0,07 <sup>c</sup> |
| Citrato         | 4,68±0,05 <sup>a</sup>                          | 0,21±0,00 <sup>a</sup>         | 3,28±0,01 <sup>c</sup> |
| Fumarato        | 19,01±0,48 <sup>c</sup>                         | 0,33±0,00 <sup>c</sup>         | 2,11±0,01 <sup>a</sup> |
| Succinato       | 17,79±0,79 <sup>c</sup>                         | 0,32±0,00 <sup>c</sup>         | 2,15±0,02 <sup>a</sup> |
| Controle        | 14,99±0,87 <sup>c</sup>                         | 0,31±0,00 <sup>c</sup>         | 0,32±0,01 <sup>a</sup> |
| <i>p-values</i> | <i>&lt;0.001</i>                                | <i>&lt;0.001</i>               | <i>&lt;0.001</i>       |
| <b>pH 7.1</b>   |   |                                |                        |
|                 | <b>C (CFU mL<sup>-1</sup> x 10<sup>8</sup>)</b> | <b><math>\mu_{\max}</math></b> | <b>tdup</b>            |
| Glutamato       | 21,94±0,68 <sup>c</sup>                         | 0,34±0,00 <sup>c</sup>         | 2,04±0,02 <sup>a</sup> |
| Acetato         | 11,24±0,47 <sup>c</sup>                         | 0,28±0,00 <sup>c</sup>         | 2,44±0,03 <sup>a</sup> |
| Propionato      | 11,01±0,54 <sup>c</sup>                         | 0,28±0,00 <sup>c</sup>         | 2,45±0,04 <sup>a</sup> |
| Butirato        | 15,96±0,76 <sup>c</sup>                         | 0,31±0,00 <sup>c</sup>         | 2,21±0,03 <sup>a</sup> |
| Formiato        | 9,51±0,35 <sup>b</sup>                          | 0,27±0,00 <sup>b</sup>         | 2,56±0,03 <sup>b</sup> |
| Citrato         | 4,77±0,27 <sup>a</sup>                          | 0,21±0,00 <sup>a</sup>         | 3,26±0,07 <sup>c</sup> |
| Fumarato        | 19,57±0,45 <sup>c</sup>                         | 0,33±0,00 <sup>c</sup>         | 2,10±0,01 <sup>a</sup> |
| Succinato       | 24,86±0,88 <sup>c</sup>                         | 0,35±0,00 <sup>c</sup>         | 1,98±0,02 <sup>a</sup> |
| Controle        | 17,65±0,78 <sup>c</sup>                         | 2,250±0,00 <sup>c</sup>        | 2,15±0,01 <sup>a</sup> |
| <i>p-values</i> | <i>&lt;0.001</i>                                | <i>&lt;0.001</i>               | <i>&lt;0.001</i>       |

Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Já os demais sais orgânicos não influenciaram significativamente a concentração do probiótico não obtendo diferenças significativas da velocidade, tempo de duplicação e concentração frente ao controle após 12 horas de experimento.

Contudo, após 24 horas a concentração final de *L. plantarum* alcançou valores significativamente superiores com o fumarato, glutamato e succinato de sódio (em ambos os valores de pH) e concentrações menores com o formiato e citrato de sódio quando comparados com o controle (Figura 2). Sais orgânicos como o butirato e propionato de sódio não alteraram a concentração final do *L. plantarum*.



**Figura 2** Concentração final de *L. plantarum* com diferentes sais orgânicos em dois valores de pH após 24 horas de crescimento.

### 11.2. Efeito *in vitro* dos sais orgânicos e a bactéria probiótica frente a diferentes bactérias patogênicas

A inibição *in vitro* das bactérias patogênicas pelos sais orgânicos e a bactéria probiótica foi significativamente maior quando o probiótico estava presente ( $p < 0,05$ ) em todos os testes. No pH 6.2, o propionato e acetato de sódio com ou sem probiótico, e o butirato isolado foram os sais orgânicos mais eficazes contra *V. alginolyticus*. Frente a *A. hydrophila*, *E. coli*, e *P. aeruginosa*, o propionato de sódio apresentou o maior poder inibitório quando usado em conjunto com *L. plantarum*. Já para *S. agalactiae* os melhores sais orgânicos foram o fumarato unicamente na presença do probiótico, seguido do citrato que inibiu tanto isoladamente como em conjunto com o *L. plantarum* (tabela 3).

Sais como o fumarato de sódio não tiveram efeito tóxico frente a nenhuma das bactérias patogênicas na ausência do probiótico. Ao ser usado isoladamente, o succinato de sódio teve efeito tóxico somente frente a *E.coli* e *P. aeruginosa*, enquanto que o citrato só inibiu *V. alginolyticus* e *S. agalactiae*. Por sua vez, o glutamato de sódio isolado só teve efeito inibitório frente a *E. coli*, e ao igual que o citrato, apresentou efeito nulo frente a *P. aeruginosa* mesmo na presença do probiótico. Em ambos os valores de pH o *S. agalactiae* foi menos sensível frente aos sais de ácido orgânico comparado com as demais bactérias patogênicas testadas.

A análise estatística revelou diferenças significativas entre os valores de pH testados ( $p < 0,05$ ), onde os sais orgânicos apresentaram maior poder inibitório no pH mais baixo (6.2). No valor de pH mais alto (7.1), alguns dos sais orgânicos apresentaram uma diminuição em sua toxicidade frente as bactérias patogênicas, e em alguns casos, perderam totalmente seu poder inibitório (Tabela 4). Como exemplo, o glutamato de sódio isolado perdeu seu poder de inibição frente a *E. coli*, o citrato e o propionato frente a *S. agalactiae*, e o succinato frente *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. agalactiae*. Porém, os melhores efeitos inibitórios frente às bactérias patogênicas foram as mesmas obtidas para o pH 6.2.

**Tabela 3** Concentração inibitória mínima (mM) dos diferentes sais orgânicos (pH 6.2) na presença ou ausência do probiótico bactéria *L. plantarum* contra diferentes bactérias patogênicas.

| <i>V. alginolyticus</i> |                              |                             |                             |                              |                              |                             |                             |                             |       |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
|                         | FUM                          | FOR                         | BUT                         | ACE                          | PRO                          | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P   |
| S/<br>P                 | N                            | 36,76±0,<br>00 <sup>f</sup> | 1,89±<br>0,82 <sup>d</sup>  | 0,24±<br>0,00 <sup>abc</sup> | 0,27±<br>0,12 <sup>abc</sup> | N                           | 1,61±<br>0,70 <sup>d</sup>  | N                           | <0,00 |
| C/<br>P                 | 0,98±<br>0,85 <sup>bcd</sup> | 1,91±<br>0,66 <sup>d</sup>  | 0,07±<br>0,03 <sup>a</sup>  | 0,16±<br>0,07 <sup>a</sup>   | 0,17±<br>0,06 <sup>ab</sup>  | 1,68±<br>0,00 <sup>d</sup>  | 1,01±<br>0,35 <sup>cd</sup> | 4,46±<br>0,01 <sup>e</sup>  | 01    |
| <i>A. hydrophila</i>    |                              |                             |                             |                              |                              |                             |                             |                             |       |
|                         | FUM                          | FOR                         | BUT                         | ACE                          | PRO                          | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P   |
| S/<br>P                 | N                            | 73,52±0,<br>00 <sup>j</sup> | 22,71±0,<br>00 <sup>g</sup> | 30,48±0,<br>00 <sup>h</sup>  | 6,51±0,0,<br>0 <sup>c</sup>  | N                           | N                           | N                           | <0,00 |
| C/<br>P                 | 7,81±0,<br>00 <sup>d</sup>   | 9,19±<br>0,00 <sup>e</sup>  | 5,68±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 7,62±<br>0,00 <sup>e</sup>   | 3,25±<br>0,00 <sup>a</sup>   | 6,68±<br>0,00 <sup>c</sup>  | 9,69±0,<br>00 <sup>f</sup>  | 35,71±0,<br>00 <sup>i</sup> | 01    |
| <i>E. coli</i>          |                              |                             |                             |                              |                              |                             |                             |                             |       |
|                         | FUM                          | FOR                         | BUT                         | ACE                          | PRO                          | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P   |
| S/<br>P                 | N                            | 36,76±0,<br>00 <sup>c</sup> | 5,68±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 6,35±<br>2,20 <sup>b</sup>   | 3,25±<br>0,00 <sup>b</sup>   | 26,72±0,<br>00 <sup>e</sup> | N                           | 35,71±0,<br>00 <sup>c</sup> | <0,00 |
| C/<br>P                 | 3,91±0,<br>00 <sup>b</sup>   | 4,59±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 2,84±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 3,81±<br>0,00 <sup>b</sup>   | 0,81±<br>0,00 <sup>a</sup>   | 3,34±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 4,04±1,<br>40 <sup>b</sup>  | 8,93±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 01    |
| <i>P. aeruginosa</i>    |                              |                             |                             |                              |                              |                             |                             |                             |       |
|                         | FUM                          | FOR                         | BUT                         | ACE                          | PRO                          | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P   |
| S/<br>P                 | N                            | 36,76±0,<br>00 <sup>k</sup> | 22,71±0,<br>00 <sup>i</sup> | 15,24±0,<br>00 <sup>g</sup>  | 6,51±<br>0,00 <sup>c</sup>   | N                           | N                           | 35,71±0,<br>00 <sup>j</sup> | <0,00 |
| C/<br>P                 | 7,81±0,<br>00 <sup>e</sup>   | 9,19±<br>0,00 <sup>f</sup>  | 5,68±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 7,62±<br>0,00 <sup>d</sup>   | 3,25±<br>0,00 <sup>a</sup>   | N                           | N                           | 17,86±0,<br>00 <sup>h</sup> | 01    |
| <i>S. agalactiae</i>    |                              |                             |                             |                              |                              |                             |                             |                             |       |
|                         | FUM                          | FOR                         | BUT                         | ACE                          | PRO                          | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P   |
| S/<br>P                 | N                            | N                           | 22,71±0,<br>00 <sup>f</sup> | N                            | 52,05<br>±0,00 <sup>j</sup>  | N                           | 9,69±0,<br>00 <sup>b</sup>  | N                           | <0,00 |
| C/<br>P                 | 7,82±0,<br>00 <sup>a</sup>   | 18,38±0,<br>00 <sup>e</sup> | 11,36±0,<br>00 <sup>c</sup> | 30,48±0,<br>00 <sup>h</sup>  | 26,02±0,<br>00 <sup>g</sup>  | 13,36±0,<br>00 <sup>d</sup> | 9,69±0,<br>00 <sup>b</sup>  | 35,71±0,<br>00 <sup>i</sup> | 01    |

Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). N: não houve inibição. S/P: sem probiótico. C/P: com probiótico FUM- fumarato, FOR- formiato, BUT-butirato, ACE-acetato, PRO-propionato, GLU-glutamato, CIT-citrato, SUC-succinato. V-P: Valor-p.

**Tabela 4** Concentração inibitória mínima (mM) dos diferentes sais orgânicos (pH 7.1) na presença ou ausência do probiótico bactéria *L. plantarum* contra diferentes bactérias patogênicas

| <i>V. alginolyticus</i> |                             |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |             |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
|                         | FUM                         | FOR                         | BUT                          | ACE                         | PRO                         | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P         |
| S/<br>P                 | N                           | 73,52±<br>0,00 <sup>d</sup> | 2,37±<br>0,82 <sup>b</sup>   | 0,40±<br>0,14 <sup>a</sup>  | 0,34±<br>0,12 <sup>a</sup>  | N                           | 2,02±<br>0,70 <sup>b</sup>  | N                           | <0,0<br>001 |
| C/<br>P                 | 0,16±<br>0,07 <sup>a</sup>  | 2,30±<br>0,00 <sup>b</sup>  | 0,53±<br>0,31 <sup>a</sup>   | 0,24±<br>0,00 <sup>a</sup>  | 0,68±<br>0,23 <sup>a</sup>  | 2,78±<br>0,96 <sup>b</sup>  | 2,02±<br>0,70 <sup>b</sup>  | 4,46±<br>0,00 <sup>c</sup>  |             |
| <i>A. hydrophila</i>    |                             |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |             |
|                         | FUM                         | FOR                         | BUT                          | ACE                         | PRO                         | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P         |
| S/<br>P                 | N                           | 73,52±<br>0,00 <sup>k</sup> | 45,42±0<br>,00 <sup>j</sup>  | 60,95±<br>0,00 <sup>h</sup> | 6,51±<br>0,00 <sup>c</sup>  | N                           | N                           | N                           | <0,0<br>001 |
| C/<br>P                 | 7,81±<br>0,00 <sup>e</sup>  | 9,19±<br>0,00 <sup>f</sup>  | 5,68±<br>0,00 <sup>b</sup>   | 7,62±<br>0,00 <sup>d</sup>  | 3,25±<br>0,00 <sup>a</sup>  | 6,68±<br>0,00 <sup>c</sup>  | 9,69±<br>0,00 <sup>g</sup>  | 35,71<br>±0,00 <sub>i</sub> |             |
| <i>E. coli</i>          |                             |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |             |
|                         | FUM                         | FOR                         | BUT                          | ACE                         | PRO                         | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P         |
| S/<br>P                 | N                           | 36,76±<br>0,00 <sup>f</sup> | 11,36±0<br>,00 <sup>de</sup> | 15,23±<br>0,00 <sup>e</sup> | 3,25±<br>0,00 <sup>bc</sup> | N                           | N                           | N                           | <0,0<br>001 |
| C/<br>P                 | 3,91±<br>0,00 <sup>bc</sup> | 4,59±<br>0,00 <sup>c</sup>  | 2,84±<br>0,00 <sup>b</sup>   | 3,81±<br>0,00 <sup>bc</sup> | 1,08±<br>0,47 <sup>a</sup>  | 3,34±<br>0,00 <sup>bc</sup> | 3,23±<br>1,40 <sup>bc</sup> | 8,93±<br>0,00 <sup>d</sup>  |             |
| <i>P. aeruginosa</i>    |                             |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |             |
|                         | FUM                         | FOR                         | BUT                          | ACE                         | PRO                         | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P         |
| S/<br>P                 | N                           | 73,52±<br>0,00 <sup>i</sup> | 22,71±0<br>,00 <sup>g</sup>  | 30,48±<br>0,00 <sup>h</sup> | 6,51±0,<br>00 <sup>c</sup>  | N                           | N                           | N                           | <0,0<br>001 |
| C/<br>P                 | 7,81±0<br>,00 <sup>e</sup>  | 9,19±0,<br>00 <sup>c</sup>  | 5,68±0,<br>00 <sup>b</sup>   | 7,62±0,<br>00 <sup>d</sup>  | 3,25±0,<br>00 <sup>a</sup>  | N                           | N                           | 17,86<br>±0,00 <sub>f</sub> |             |
| <i>S. agalactiae</i>    |                             |                             |                              |                             |                             |                             |                             |                             |             |
|                         | FUM                         | FOR                         | BUT                          | ACE                         | PRO                         | GLUT                        | CIT                         | SUC                         | V-P         |
| S/<br>P                 | N                           | N                           | 45,42±0<br>,00 <sup>g</sup>  | N                           | N                           | N                           | N                           | N                           | <0,0<br>001 |
| C/<br>P                 | 7,82±0<br>,00 <sup>a</sup>  | 18,38±<br>0,00 <sup>d</sup> | 11,36±0<br>,00 <sup>b</sup>  | 30,48±<br>0,00 <sup>f</sup> | 26,02±<br>0,00 <sup>e</sup> | 13,36±<br>0,00 <sup>c</sup> | N                           | N                           |             |

Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05). N: não houve inibição. S/P: sem probiótico. C/P: com probiótico FUM- fumarato, FOR-formiato, BUT-butirato, ACE-acetato, PRO-propionato, GLU-glutamato, CIT-citrato, SUC-succinato. V-P: Valor-p.



## 12. Discussão

O efeito inibitório do citrato e formiato de sódio frente a *L. plantarum* pode ser explicado por um dos mecanismos de inibição dos ácidos orgânicos, penetrando na parede celular bacteriana em sua forma não ionizada e conseqüentemente alterando o pH intracelular (Lückstädt, 2008, Defoidt et al., 2009). Este mecanismo de ação pode estar potencializado no citrato de sódio, que diferentemente dos outros sais de ácidos orgânicos testados, possui três grupos carboxílicos que poderia aumentar a possibilidade deste sal se encontrar em sua forma não dissociada (forma tóxica) (Cherrington et al., 1991). Adicionalmente, por ser tricarboxílico sua constante de dissociação possui três valores  $pK= 3.15, 4.76, 6.39$ , o que significa que em pH 3.15, 4.76 e 6.39 cada grupo carboxílico se encontra 50% dissociado e 50% não dissociado (Cherrington et al., 1991). Deste modo, nos dois valores de pH testados (6.2 e 7.1) o citrato teoricamente possui um grupo carboxílico na sua maioria na forma não dissociada (tóxica), enquanto que os outros dois grupos estariam com moléculas não dissociadas em menor concentração.

Já o formiato de sódio só tem um grupo carboxílico com valor  $pK= 3.77$ , indicando que em pH 6.2 como no pH 7.1 se encontraria totalmente dissociado, por tanto, estaria na sua forma não tóxica. Contudo, as bactérias ácido lácticas se caracterizam por produzir diferentes ácidos orgânicos diminuindo o pH do seu entorno, assim, durante o crescimento da bactéria probiótica o meio poderia ter sofrido alterações no seu pH, influenciando no aumento das formas não dissociadas tanto do citrato como do formiato de sódio, aumentando sua toxicidade (Cherrington et al., 1991).

Os sais dicarboxílicos como o glutamato ( $pK= 2.10, 9.47$ ), fumarato ( $pK= 3.03, 4.5$ ) e succinato ( $pK= 4.2, 5.6$ ) estimularam o crescimento do probiótico. Nos valores de pH testados, estes sais estariam predominantemente na sua forma dissociada resultando em um menor efeito inibitório, exceto o glutamato de sódio que possui um grupo carboxílico que poderia ser tóxico para a célula. Apesar disso, este sal estimulou o crescimento de *L. plantarum* tal vez devido à estabilização proteica através de reações entre o grupo amino do preservante e os grupos carboxila das proteínas do micro-organismo (Carvalho et al., 2003). Por isto, o glutamato de sódio é amplamente utilizado como criopreservantes de bactérias ácido lácticas (Hubálek, 2003). Adicionalmente, o glutamato com seu grupo amino pode servir como fonte de nitrogênio para a célula e por sua vez, ao ser precursor da

glutamina, pode auxiliar na síntese proteica aumentando a viabilidade do probiótico (Newsholme et al., 2003).

Por outro lado, o succinato e fumarato de sódio poderiam estar modulando a cadeia de transporte de elétrons da bactéria e fazendo parte de rotas metabólicas servindo como fontes de energia (Lehninger; Nelson; Cox, 2007).

Os sais orgânicos avaliados apresentaram melhores resultados de inibição contra as bactérias patogênicas na presença de *L. plantarum*. Alguns sais orgânicos formam parte dos requerimentos nutricionais das bactérias ácido lácticas (Defoirdt et al., 2009) o que poderia resultar em um aumento da sua concentração, melhorando o efeito inibitório obtido com os sais orgânicos. Kung et al (2004) sugerem que o uso de ácidos orgânicos, tais como o ácido propiônico, em combinação com a inoculação com bactérias ácido-lácticas, pode ser benéfico para o inóculo bacteriano em si, melhorando processos de fermentação. Adicionalmente, as bactérias ácido lácticas ao diminuir o pH do meio, aumentam a concentração da forma não dissociada dos sais orgânicos incrementando seu poder bactericida (Marschner, 1995).

No pH 6.2, os resultados sugerem que os sais monocarboxílicos como o propionato, butirato e acetato, apresentaram os melhores efeitos inibitórios frente às bactérias gram negativas. Ao possuírem valores de pK acima de 4.7, estes sais estariam com uma concentração maior de moléculas não dissociadas que o formiato (monocarboxílico) que ao possuir um pK= 3.77, teve um efeito menos tóxico.

Os sais orgânicos dicarboxílicos não foram tão eficientes quanto os monocarboxílicos, sugerindo que estes sais orgânicos ao invés de inibir, estariam sendo utilizados como fonte de energia pelas bactérias patogênicas, pois na maioria das vezes não apresentaram efeito inibitório na ausência do probiótico.

O citrato de sódio, sendo um tricarboxílico, estaria com dois dos seus grupos carboxílicos exercendo efeito tóxico para as bactérias patogênicas. Contudo, este sal não apresentou os melhores resultados de inibição, e frente a algumas bactérias teve efeito nulo. Portanto, estas bactérias poderiam estar usando o citrato como fonte de carbono a través do ciclo de ácido tricarboxílico anulando seu efeito inibitório. No caso do *S. agalactiae*, o citrato teve o efeito contrário e apresentou efeito inibitório, sugerindo que este sal ao invés de ser utilizado como substrato, estaria exercendo seu efeito tóxico, já que ao igual que *L. plantarum*, *S. agalactiae* carece de ciclo de Krebs funcional e utiliza outras rotas metabólicas de fermentação (Salminen e Wright, 1998).

Os resultados do presente estudo mostraram efeitos inibitórios *in vitro* maiores no pH 6.2 do que em pH 7.1. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2013), obtendo uma maior inibição de *Vibrio* spp. na presença de sais orgânicos em valores de pH mais baixos. Variações de pH no meio são importantes porque afetam a permeabilidade das membranas frente aos ácidos devido a alteração da proporção de moléculas dissociadas e não dissociadas no meio (Marschner, 1995). Em pH 7.1 os sais tiveram um menor efeito inibitório frente as bactérias devido a que quando o pH do meio aumenta, também aumenta o predomínio da forma dissociada do ácido o que impede que a molécula penetre pela membrana celular, tornando os sais menos tóxicos para a célula (Defoirdt et al., 2009).

Adicionalmente valores de pH entre 4.5 e 6.2 favorecem o crescimento de bactérias ácido lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (Hammes e Hertel, 2006), enquanto que a maioria das bactérias patogênicas testadas crescem melhor em valores de pH superiores a 7 (Gale e Epps 1942; Nakamura et al, 1982; Thomas et al. 1994; Yan et al. 2012).

Os ácidos orgânicos além de diminuir o pH intracelular, também são capazes de formar complexos quelantes com os minerais, indisponibilizando micronutrientes e limitando o crescimento de outros microrganismos (Jones, 1998; Cardoso e Nogueira, 2007). As bactérias crescem mais lentamente na ausência de minerais essenciais, tais como o ferro. Neste sentido, a presença de microrganismos ou substâncias que produzam complexos quelantes podem inibir seu crescimento (Patel et al, 1995; Whitaker et al. 2010).

Já as bactérias ácido-lácticas além de competição por nutrientes, devem seu poder inibitório à produção de diferentes compostos como peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e ácidos orgânicos (Gatesoupe, 2008). Experimentos confirmam o potencial probiótico de diferentes espécies de *Lactobacillus* para inibir patógenos específicos por meio da produção de compostos inibitórios como os ácidos orgânicos (Vasquez et al. 2005; Tejero-Sariñena et al., 2012), que poderiam estar complementando a ação dos sais orgânicos utilizados neste experimento.

Em geral, o *S. agalactiae* foi menos sensível aos efeitos dos sais orgânicos tal vez devido ao fato de que é uma bactéria gram-positiva, caracterizadas por possuir uma espessa camada de peptidoglicanos na sua parede celular do lado de fora da membrana celular, tornando-as mais resistentes (Salminen e Wright, 1998).

Finalmente, os resultados obtidos na inibição frente às bactérias patógenas, podem indicar que existe uma relação espécie-específica, pois alguns sais foram melhores que outros dependendo da bactéria.

### 13. Conclusões

Em ambos os pH (6.2 e 7.1), o crescimento de *L. plantarum* foi inibido pelo citrato e formiato de sódio e estimulado pelo glutamato, fumarato, succinato de sódio. O propionato, butirato e acetato de sódio não influenciaram no crescimento do probiótico.

Em ambos os valores de pH (6.2 e 7.1), butirato, acetato e propionato de sódio apresentaram maior poder inibitório contra *V. alginolyticus*, o propionato de sódio contra *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e o fumarato de sódio contra o *S. agalactiae*.

O uso de sais orgânicos em conjunto com *L. plantarum* aumenta o poder inibitório frente a bactérias patógenas.

### 14. Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/475906/2012-8) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES PEC-PG).

### 15. Referencias

- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P (2003) Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait* 83, 203-210.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L (2010) Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish Shellfish Immunol* 28, 622-631.
- Cherrington C.A., Hinton M., Meada G.C., Choprab I (1991). *Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications*. *Advances in Microbial Physiology* 32, 87-108.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P (2009) Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology advances* 27, 680-685.

- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol* 14, 251-258.
- FAO (2014) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*. Rome. 223 p.
- Franco, L.D., Fondevila, M., Lobera, M.B., Castrillo, C (2005) Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. *J Anim Physiol Anim Nutr* 89, 88-93.
- Gale, E.F., Epps, H.M.R (1942) The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *The Biochem J* 36, 600-618.
- Gatesoupe, F.J. (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments *J Mol Microbiol Biotechnol* 14, 107-114.
- Graslund, S., Holmstrom, K., Wahlstrom, A (2003) A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Mar Pollut Bull* 46, 81-90.
- Hammes, W.P., Hertel, C (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, The prokaryotes. Springer, pp. 320-403.
- Hubalek, Z (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46, 205-229.
- Iba, A.M., Berchieri, A., Jr (1995) Studies on the use of a formic acid-propionic acid mixture (Bio-add) to control experimental *Salmonella* infection in broiler chickens. *Avian pathol* 24, 303-311.
- Jones, D.L (1998) Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and soil*. 205, 25-44.
- Kung Jr, L., Myers, C., Neylon, J., Taylor, C., Lazartic, J., Mills, J., Whiter, A (2004) The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and whole-crop barley. *J Dairy Sci* 87, 1310-1316.
- Lafferty K. D, Harvell C. D, Conrad J. M, Friedman C. S, Kent M. L, Kuris A. M, Powell E. N, Rondeau D, Saksida S. M (2015) Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annu Rev Mar Sci* 7, 11.1–11.26
- Lehninger, A.L. Nelson, D.A.; Cox, M.M. *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers, 2007. 1232p.

- N., D.A.; Cox, M.M (2007) Principles of biochemistry. New York: Worth Publishers.
- Lightner, D.V (2011) Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J Invertebr Pathol* 106, 110-130.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Tang, K.F., Noble, B.L., Schofield, P., Mohny, L.L., Nunan, L.M., Navarro, S.A (2012) Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J Invertebr Pathol* 110, 174-183.
- Luckstadt, C (2008) The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3, 1-8.
- Nakamura, T.; Tokuda, H.; Unemoto, T (1982) Effects of pH and monovalent cations on the potassium ion exit from the marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, and the manipulation of cellular cation contents. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes*, 692, 389-396.
- Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 2003;21:1-9.
- Partanen, K.H., Mroz, Z (1999). Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 12, 117-145.
- Patel, M., Isaäcson, M., Gouws, E (1995) Effect of iron and pH on the survival of *Vibrio cholerae* in water. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89, 175-177.
- Silva, B.C., Vieira, F.d.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q (2013) Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture*. 384, 104-110.
- Salminen, S., Wright, A (1998). Lactic acid bacteria, 2<sup>nd</sup> ed., Marcell Decker Inc., New York-Basel
- Tejero-Sarinena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G.R., Rowland, I (2012) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18, 530-538.
- Thomas, K.L., Lloyd, D., Boddy, L (1994) Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol Lett* 118, 181-186.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., Lightner, D.V (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis

- syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ* 105, 45-55.
- Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*. 245, 149-161.
- Vieira, F.d.N., Pedrotti, F.S., Buglione Neto, C.C., Mouriño, J.L.P., Beltrame, E., Martins, M.L., Ramirez, C., Arana, L.A.V (2007) Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz J Oceanogr*. 55, 251-255.
- Whitaker, W.B., Parent, M.A., Naughton, L.M., Richards, G.P., Blumerman, S.L., Boyd, E.F (2010) Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Appl Environ Microbiol* 76, 4720-4729.
- Yang, Q., Porter, A.J., Zhang, M., Harrington, D.J., Black, G.W., Sutcliffe, I.C (2012) The impact of pH and nutrient stress on the growth and survival of *Streptococcus agalactiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 102, 277-287.
- Zar, J.H (1984) *Biostatistical Analysis*, 2 ed. Prentice Hall.

## 16. CAPITULO III: Uso de sais orgânicos e probiótico no desempenho de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara

### Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso em conjunto e isoladamente do probiótico *L. plantarum* e o sal orgânico butirato de sódio no desempenho de *L. vannamei*. Os aditivos foram incorporados na alimentação resultando em quatro dietas diferentes: a) sal orgânico; b) probiótico; c) sal orgânico+probiótico; d) controle (sem aditivos). Os camarões foram alimentados durante quatro semanas e foram avaliados os parâmetros zootécnicos (ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência), a microbiota intestinal (*Vibrios* spp. totais, bactérias heterotróficas totais e bactérias ácido lácticas) e parâmetros imunológicos (contagem de hemócitos totais, atividade da PO e título aglutinante do soro). A seguir, os camarões foram desafiados com *V. alginolyticus* e depois de 48 horas foram avaliados a sobrevivência e parâmetros imunológicos. Após quatro semanas, não houve diferença significativa nos parâmetros zootécnicos ou imunológicos dos camarões dos diferentes tratamentos. Nas contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais do trato intestinal tampouco houve diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, a contagem de bactérias ácido lácticas foi superior no trato intestinal dos camarões que receberam probiótico isolado ou em conjunto com o sal orgânico na dieta. No desafio experimental, os camarões de todos os tratamentos tiveram uma maior sobrevivência quando comparados com o grupo controle. Do presente trabalho podemos concluir que o *L. plantarum* e o butirato de sódio aumentaram a resistência do camarão frente à infecção com *V. alginolyticus* sem alterar os parâmetros zootécnicos.

### 17. Introdução

A produção mundial de camarões marinhos em cativeiro, em franco crescimento, atingiu a marca de 4,4 milhões de toneladas produzidas em 2013 (FAO 2015). O camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, é a espécie mais cultivada, sendo responsável por 73,2% do volume total produzido (FAO, 2012). Contudo, a carcinicultura tem sido drasticamente reduzida em alguns países devido ao surgimento de várias doenças (Lightner 2011), entre elas a síndrome da mortalidade precoce (EMS, Early Mortality Syndrome) causada por uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, principalmente na Ásia e na



América Latina (Lightner et al., 2012; Tran et al., 2013). Infecções causadas por bactérias do gênero *Vibrio* são consideradas um problema importante no cultivo de camarões, causando sintomas como anorexia, inatividade, baixa taxa de crescimento, necrose muscular e consequentemente mortalidades (Chiu et al., 2007; Lafferty et al. 2015).

Como tratamento contra as vibrioses, os antibióticos têm sido comumente usados, contudo, o mau uso na aquicultura tem levado ao aparecimento de bactérias resistentes (Deifordt et al., 2011). Estudos realizados relatam que várias espécies de vibrios desenvolveram resistência frente a antibióticos como enrofloxacin, eritromicina e cloranfenicol, antibióticos comumente usados nos cultivos de camarão (Kitiyodom et al., 2010). Adicionalmente, o uso dos antibióticos na aquicultura pode gerar impactos tanto no meio ambiente como na saúde humana pelo consumo de carne com resíduos (Graslund et al., 2003; Costanzo et al., 2005). Portanto, para um desenvolvimento sustentável do sector da aquicultura, novas medidas sem o uso de antibióticos para controlar infecções bacterianas são necessárias.

Probióticos e ácidos orgânicos (e seus sais) têm sido adotados amplamente em cultivos aquícolas como medidas alternativas preventivas para diminuir surtos de enfermidades bacterianas. Os probióticos podem ser definidos como um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando seu balanço microbiano (Gram et al., 1999). Estes têm a capacidade de inibir bactérias patogênicas e estimular o sistema imune sem causar resistências e deixar resíduos. As bactérias ácido-lácticas são amplamente utilizadas como probióticos por serem de fácil multiplicação, produzir compostos antimicrobianos (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e láctico) e estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (Gatesoupe, 2008). O uso de bactérias ácido-lácticas tem mostrado resultados positivos na inibição *in vitro* e *in vivo* de diferentes patógenos em cultivos de camarão (Castex et al., 2010; Chiu et al., 2007; Vieira et al., 2010; Vieira et al., 2013).

Os ácidos orgânicos também são capazes de inibir bactérias (principalmente gram negativas) reduzindo o pH do seu entorno e formando complexos quelatos com minerais essenciais como o ferro, limitando o crescimento de outros micro-organismos (Jones, 1998; Lückstädt, 2008). Muitos dos ácidos orgânicos estão também disponíveis em sais de sódio, potássio ou cálcio, possuindo a vantagem de serem inodoros, menos corrosivos, mais solúveis em água e de fácil manipulação durante a adição na ração devido a sua solidez e pouca volatilização (Partanen; Mroz, 1999). Alguns ácidos e seus sais já

demonstraram seu poder inibitório *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes espécies de *Vibrio*, diminuindo sua concentração no trato intestinal de *L. vannamei* (Mine e Boopathy, 2011; Silva et al., 2013).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso em conjunto e isoladamente do probiótico *L. plantarum* e do sal orgânico butirato de sódio no desempenho do camarão branco do Pacífico *L. vannamei*.

## **18. Metodologia**

A cepa bacteriana utilizada como probiótico foi o *L. plantarum*, isolada de camarões adultos de *L. vannamei* (VIEIRA et al., 2007) e mantida na coleção de micro-organismos do setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. O sal orgânico avaliado foi o butirato de sódio ( $C_3H_7COONa$ ) escolhido por apresentar os melhores resultados *in vitro* frente a *V. alginolyticus* entre oito sais diferentes em testes prévios (capítulo II).

### **18.1. Preparação das dietas**

As dietas foram preparadas no Laboratório de laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (Labnutri, Ufsc) de acordo com a fórmula apresentada na tabela 1. Os ingredientes secos foram moídos e peneirados (600  $\mu$ m) e os macroingredientes foram misturados por 10 minutos e em seguida adicionados os microingredientes previamente misturados. Por último foram adicionados os óleos e a lecitina de soja e misturados até formar uma farinha homogênea. Posteriormente foi adicionada água para ajustar a umidade da ração em 25% para posteriormente passar pela extrusora. Todas as rações foram secadas até atingir 10% de umidade.

**Tabela 5** Composição da dieta referência utilizada no ensaio de crescimento em água clara com *L. vannamei*.

| <b>Ingredientes</b>         | <b>g . kg<sup>-1</sup></b> |
|-----------------------------|----------------------------|
| Farelo de soja              | 424                        |
| Farinha de resíduo de peixe | 232                        |
| Farinha de trigo            | 150                        |
| Caulim                      | 84                         |
| Lecitina                    | 30                         |
| Fosfato monocalcico         | 20                         |
| Premix mineral-vitamínico   | 15                         |
| Cloreto de sódio            | 12                         |
| Óleo de soja                | 10                         |
| Óleo de fígado de bacalhau  | 10                         |
| Sulfato de magnésio         | 7,7                        |
| Aglutinante (CMC)           | 5,0                        |
| Vitamina C                  | 0,6                        |

As dietas foram divididas da seguinte forma: a) sal orgânico, b) probiótico, c) sal orgânico + probiótico e d) controle (dieta sem aditivos). Foi utilizado 2% do sal orgânico (p/p) na ração e 100 mL de probiótico (1x10<sup>7</sup> UFC/mL) por quilograma adicionado na dieta de acordo com a metodologia descrita por Vieira et al. (2008). O butirato de sódio foi adicionado substituindo o caulim, utilizado como ingrediente de preenchimento.

A composição centesimal das dietas (tabela 5) foi realizada conforme a metodologia descrita pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2005). A matéria seca (MS) foi calculada por análise gravimétrica após secagem em estufa a 100 °C durante 24 h. O teor de cinzas (CZ) foi determinado gravimetricamente por queima, num forno de mufla a 550 °C durante 6 h (942.05 em AOAC, 2005). O método de Kjeldahl (2001.11 em AOAC, 2005) foi usado para determinar o teor de proteína bruta (PB). Fibra bruta (FB) e extrato etéreo com hidrólise ácida (EEA) foram analisados pelos métodos 978.10 e 2003.05, respectivamente (AOAC, 2005). Os extratos não nitrogenados (ENN) foram calculados pela diferença entre a MS e a soma de CZ, FB, PB e EEA.

**Tabela 6** Composição centesimal das dietas utilizadas para engorda de *L. vannamei* em água clara.

| Nutriente        | Controle |       | Butirato |       | Probiótico |       | Butirato+<br>probiótico |       |
|------------------|----------|-------|----------|-------|------------|-------|-------------------------|-------|
|                  | MU       | MS    | MU       | MS    | MU         | MS    | MU                      | MS    |
| Umidade %        | 89,19    | 10,81 | 89,21    | 9,79  | 89,43      | 10,6  | 89,88                   | 10,12 |
| Proteína Bruta % | 35,24    | 39,51 | 36,39    | 40,08 | 37,15      | 41,54 | 37,76                   | 42,01 |
| Extrato etéreo % | 7,93     | 8,89  | 7,86     | 8,66  | 7,61       | 8,51  | 7,68                    | 8,54  |
| FDA %            | 5,58     | 6,25  | 4,18     | 4,61  | 3,7        | 4,13  | 4,90                    | 5,45  |
| Cinzas %         | 19,37    | 21,72 | 18,74    | 20,64 | 19,46      | 21,76 | 18,8                    | 20,91 |

### 18.2. *MU: matéria úmida*

MS: matéria seca

FDA: fibra em detergente ácido

### 18.3. *Teste de atratividade*

Foram utilizados 60 camarões com um peso entre de 4,2 a 6,0g. Antes de cada teste os mesmos foram mantidos em jejum por 24 horas para estimular a resposta à alimentação antes de cada teste. Foram utilizados aquários em formato labirinto “Y” seguindo a metodologia descrita por Nunes et al. (2006). Em cada observação, foi acondicionado um camarão por vez em cada aquário e juntamente foram colocadas duas dietas (2 g de cada), uma em cada extremidade do aquário. Se o camarão não detectasse ou escolhesse nenhuma das opções dentro de 7 minutos, a observação era interrompida e o espécime substituído por outro e submetido ao processo novamente. Após cada teste 100% da água foi trocada para evitar que os resíduos das dietas utilizadas interferissem nos testes. Os números de escolhas positivas e rejeições foram calculados em percentagem para realizar uma comparação final para cada dieta.

### 18.4. *Engorda em água clara*

Foram utilizados camarões da espécie *L. vannamei* com um peso inicial de  $5,28 \pm 0,08$ g e foram estocados em 16 tanques de 800L em uma densidade de 40 camarões/m<sup>3</sup>. O experimento teve uma duração de quatro semanas entre os meses de Abril – Maio de 2015.

Os animais foram alimentados com as dietas descritas no item 18.1 em uma quantidade equivalente a 6% da biomassa, dividida em quatro vezes ao dia. A alimentação foi ajustada de acordo com as biometrias realizadas semanalmente. Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata,

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram mensurados diariamente (YSI, modelo Pro 20, pH YSI, modelo Professional Plus) e a salinidade foi mantida em 30ppm. A água dos tanques foi renovada todos os dias (30%) até retirar os restos de alimento, fezes e mudas. O pH, amônia e nitritos dos tanques também foram mensurados uma vez por semana para monitorar a qualidade da água.

#### **18.4.1. Parâmetros zootécnicos**

Foram realizadas biometrias semanais de 15 camarões por tanque e no final da engorda foram avaliados o ganho de peso semanal, conversão alimentar e sobrevivência.

#### **18.4.2. Microbiota intestinal**

Foram amostrados intestinos de 10 camarões de cada tanque (dois pools de cinco) somando em total 40 camarões por tratamento. Os tratos intestinais foram homogeneizados em um gral e diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3% (SSE) e semeados em meio de cultura Agar Marinho, TCBS e Agar MRS para contagem de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias lácticas totais respectivamente. Os intestinos semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa a 30°C e posteriormente efetuadas contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC) após 24 horas de incubação nos meios de cultura Agar Marine e Agar TCBS e 48 horas no meio Agar MRS.

#### **18.4.3. Parâmetros imunológicos**

A hemolinfa foi obtida do sinus ventral de um pool de cinco camarões de cada tanque (cerca de 300 uL por animal). As amostras foram coletadas com seringas estéreis de 1 mL de agulha 21G resfriadas a 4°C.

Da hemolinfa coletada, 10 uL foram fixados em solução anticoagulante Alsever modificado (MAS) (citrato de sódio 27mM, EDTA 9mM, glicose 115mM, NaCl 336mM, pH 7,2) com 4% de formaldeído para contagem total de hemócitos (THC). O restante foi

coagulado a 4°C e centrifugado repetidamente a 10.000 x g por 10 minutos para obtenção do soro que foi alíquotado e estocado a -20°C.

O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer.

A concentração de proteína na hemolinfa foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão.

A atividade da PO foi determinada por espectrofotometria (490nm) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). As amostras do soro foram diluídas (1:9) em TBS-1 (1mM Tris, 336mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6). Desta solução, 50 uL foram incubados em um volume igual de tripsina (Sigma, 1mg/mL), indutor enzimático em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 min a 25°C. Após incubação, foi adicionado um volume de 50 µL de L-DOPA (Sigma, 3mg/mL) em cada poço. Nos controles, o soro ou a tripsina foram substituídos por TBS-1. A formação do DOPA-cromo foi monitorada em Leitora de Microplaca (490 nm) após 5, 10, 15 e 20 min. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligramma de proteína (SÖDERHÄLL, HALL, 1984) por 15 minutos a 20°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a atividade aglutinante do soro, inicialmente foram depositados 50µL de solução TBS (50mM Tris, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl, pH 7,4) em todos os poços de microplaca de fundo em “U”. Posteriormente foi adicionado no primeiro poço 50µL do soro diluído 12x em TBS, e seguido foram realizadas diluições seriadas nos poços subsequentes. Ao final, 50µL de solução de eritrócitos caninos em solução de NaCl 0,15M a 2% foram adicionados em cada poço e a mistura incubada por 2h em temperatura ambiente. Nos poços controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS. O título aglutinante foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda com presença de aglutinação. Este ensaio foi realizado em triplicata.

### **18.5. Desafio frente a *V. alginolyticus***

No final da engorda, 10 camarões de cada tanque foram trasladados a 16 caixas de 30 L com oxigênio e temperatura regulados para realização do desafio experimental.

Cada camarão foi injetado com 100 µL de *V. alginolyticus* em uma concentração de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> segundo teste DL<sub>50</sub> realizada previamente pelos autores (dados não apresentados). Como controle um

grupo de camarões foi injetado com 100 uL de solução salina estéril (SSE). Os camarões foram monitorados durante 48h e após esse período foi avaliada a sobrevivência e os parâmetros imunológicos descritos no item 3.3. Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata.

### ***18.6. Análises estatísticas***

Os experimentos foram analisados, depois de verificadas as premissas de normalidade e homocedasticidade dos dados, por análise de variância fatorial suplementada pelo teste Tukey de separação de médias, ambos ao nível de significância de 5%. O teste de atratividade foi analisado através do teste não paramétrico de qui-quadrado.

## **19. Resultados**

### ***19.1. Teste de atratividade***

No teste de atratividade só foi observado um maior efeito atrativo da dieta suplementada exclusivamente com butirato em relação à dieta controle (tabela 6). As demais dietas não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre si, indicando que não houve rejeição de nenhuma das dietas.

**Tabela 7** Frequência de escolhas positivas (%) dos camarões *L. vannamei* mantidos no labirinto em Y alimentados com diferentes dietas.

| Dietas              | Controle | Butirato | Probiótico | Butirato/Probiótico |
|---------------------|----------|----------|------------|---------------------|
| Controle            | -        | 80*      | 60         | 40                  |
| Butirato            | 20       | -        | 40         | 50                  |
| Probiótico          | 40       | 60       | -          | 50                  |
| Butirato/Probiótico | 60       | 50       | 50         | -                   |

\*Diferença no teste de Qui-quadrado ( $p < 0,05$ )

### 19.2. Engorda em água clara

Os parâmetros de qualidade de água se mantiveram sempre dentro dos padrões aceitáveis para cultivo de camarões marinhos (Boyd e Gautier, 2000) sem grandes variações de temperatura ( $29,56 \pm 0,30$ ), oxigênio ( $6,07 \pm 0,05$ ), pH ( $8,37 \pm 0,08$ ), amônia ( $0,55 \pm 0,19$ ) ou nitrito ( $0,13 \pm 0,11$ ).

Após quatro semanas de alimentação com as diferentes dietas, os camarões dos diferentes tratamentos não tiveram diferenças significativas entre peso final, ganho de peso semanal, conversão alimentar e sobrevivência (Tabela 7).

**Tabela 8** Parâmetros zootécnicos de *L. vannamei* cultivado em água clara e alimentado com diferentes dietas.

| Dietas              | Peso inicial (g) | Peso final (g)   | Ganho de peso semanal (g) | Conversão alimentar | Sobrevivência (%) |
|---------------------|------------------|------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|
| Controle            | $5,34 \pm 0,19$  | $12,58 \pm 0,31$ | $1,84 \pm 0,36$           | $1,9 \pm 0,16$      | $96,7 \pm 0,8$    |
| Butirato            | $5,17 \pm 0,20$  | $12,11 \pm 0,36$ | $1,74 \pm 0,29$           | $2,2 \pm 0,21$      | $98,3 \pm 0,6$    |
| Probiótico          | $5,32 \pm 0,21$  | $12,22 \pm 0,58$ | $1,73 \pm 0,40$           | $2,3 \pm 0,28$      | $97,5 \pm 0,5$    |
| Butirato+probiótico | $5,28 \pm 0,22$  | $12,35 \pm 0,55$ | $1,77 \pm 0,21$           | $2,0 \pm 0,09$      | $97,5 \pm 1,0$    |

Para a contagem de Vibrios e de bactérias heterotróficas totais no intestino não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 8) quando comparadas com o controle, enquanto



que a contagem de bactérias ácido lácticas foi maior nos tratamentos que receberam probiótico ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9** Contagem microbiológica (log) de intestino de *L. vannamei* alimentados com diferentes dietas após quatro semanas de cultivo.

| <b>Tratamento</b> | <b><i>Vibrio</i> sp.</b> | <b>Bactérias heterotróficas totais</b> | <b>Bactérias ácido-lácticas</b> |
|-------------------|--------------------------|--|---------------------------------|
| Controle          | 6,56±0,98 <sup>a</sup>   | 8,54±1,31 <sup>a</sup>                 | 0,79±1,58 <sup>a</sup>          |
| Butirato          | 7,59±0,97 <sup>a</sup>   | 8,54±0,25 <sup>a</sup>                 | 0,67±1,35 <sup>a</sup>          |
| Probiótico        | 6,97±0,79 <sup>a</sup>   | 8,33±0,41 <sup>a</sup>                 | 3,54±0,71 <sup>b</sup>          |
| But/Pro           | 7,03±0,51 <sup>a</sup>   | 8,49±0,42 <sup>a</sup>                 | 3,55±0,65 <sup>b</sup>          |

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey. But/Pro: Butirato e probiótico.

No final da engorda (antes do desafio), a contagem de hemócitos totais e a atividade aglutinante do soro dos camarões não diferiram entre os tratamentos (tabela 9) enquanto que a atividade da enzima PO foi significativamente maior no tratamento probiótico comparada com os demais grupos.

**Tabela 10** Contagem total de hemócitos (CHT), proteína do soro, atividade de fenoloxidase (PO) e título aglutinante do camarão *L. vannamei* antes e depois do desafio com *V. alginolyticus*.

| <b>Antes da infecção</b> |   |                                 |                                 |
|--------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Tratamentos</b>       | <b>CHT (<math>\times 10^6/\text{mL}</math>)</b> | <b>Atividade PO</b>             | <b>Título de aglutinação</b>    |
| Controle                 | 44,3 $\pm$ 6, <sup>3Aab</sup>                   | 27,17 $\pm$ 8,54 <sup>Ab</sup>  | 10,83 $\pm$ 0,50 <sup>A</sup>   |
| Butirato                 | 58,57 $\pm$ 6, <sup>7Ab</sup>                   | 17,51 $\pm$ 4,45 <sup>Aab</sup> | 10,58 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>   |
| Probiótico               | 29,33 $\pm$ 7,9 <sup>Aa</sup>                   | 42,38 $\pm$ 3, <sup>93Ac</sup>  | 11,33 $\pm$ 0,50 <sup>A</sup>   |
| Butirato/probiótico      | 39,1 $\pm$ 8,5 <sup>Aa</sup>                    | 14,20 $\pm$ 1,96 <sup>Aa</sup>  | 11,33 $\pm$ 0,50 <sup>A</sup>   |
| <i>valor-p</i>           | <0,006  | <0,0002                         | >0,05                           |
| <b>Após infecção</b>     |   |                                 |                                 |
| <b>Tratamentos</b>       | <b>CHT (<math>\times 10^6/\text{mL}</math>)</b> | <b>Atividade PO</b>             | <b>Título de aglutinação</b>    |
| Controle                 | 33,3 $\pm$ 7,6 <sup>Aab</sup>                   | 27,17 $\pm$ 3,11 <sup>A</sup>   | 14,08 $\pm$ 0,58 <sup>Bab</sup> |
| Butirato                 | 26,32 $\pm$ 3,9 <sup>Ba</sup>                   | 43,87 $\pm$ 6,15 <sup>B</sup>   | 13,83 $\pm$ 0,50 <sup>Bab</sup> |
| Probiótico               | 32,21 $\pm$ 1,2 <sup>Aab</sup>                  | 33,12 $\pm$ 2,48 <sup>B</sup>   | 14,83 $\pm$ 0,50 <sup>Bb</sup>  |
| Butirato/probiótico      | 45,05 $\pm$ 3,5 <sup>Ab</sup>                   | 48,12 $\pm$ 17,6 <sup>B</sup>   | 13,33 $\pm$ 0,50 <sup>Ba</sup>  |
| <i>valor-p</i>           | <0,009  | >0,05                           | <0,0001                         |

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no tempo. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Após o desafio a contagem de hemócitos totais caiu significativamente ( $p < 0,003$ ) unicamente no tratamento butirato, comparada com a contagem antes da infecção. O grupo controle não teve diferenças no número de hemócitos, comparado com os demais tratamentos. Adicionalmente, o título de aglutinação aumentou significativamente em todos os tratamentos após a infecção ( $p < 0,0001$ ) e igualmente o grupo controle não apresentou diferenças com os demais tratamentos. Na atividade da PO não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle após infecção, entretanto, a atividade da enzima foi numericamente menor no grupo controle.

No desafio experimental com *V. alginolyticus*, após 14 horas, os camarões começaram a apresentar os primeiros sintomas de letargia e necrose nos tecidos seguido das primeiras mortalidades. Passadas 48

horas foi possível observar que a sobrevivência foi significativamente maior nos tratamentos comparados com o grupo controle (Tabela 10). Porém, os resultados obtidos do uso em conjunto do probiótico e o sal orgânico não diferiram significativamente do seu uso isoladamente.

**Tabela 11** Sobrevivência de *L. vannamei* após desafio com *V. alginolyticus*.

| Tratamento            | Sobrevivência (%)      |
|-----------------------|------------------------|
| Controle              | 50±2,45 <sup>a</sup>   |
| Butirato              | 81,1±0,96 <sup>b</sup> |
| Probiótico            | 75±0,5 <sup>b</sup>    |
| Probiótico + Butirato | 76,3±1,5 <sup>b</sup>  |

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey.

## 20. Discussão

O uso de aditivos nas dietas pode alterar sua palatabilidade diminuindo ou aumentando sua atratividade, entre eles, os ácidos orgânicos ou seus sais. Silva et al (2013), obtiveram que a atratividade e o consumo de dietas comerciais para camarão aumentaram quando suplementadas com propionato e butirato sódio. Em outro estudo, foi observado que os ácidos cítricos e lácticos também aumentaram a atratividade em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*), contudo, o ácido acético e metacetônico tiveram o efeito contrário, resultando na rejeição do alimento contendo estes ácidos (Xie; Zhang e Wang, 2003). No presente trabalho a única dieta que apresentou diferenças na atratividade foi a dieta suplementada com butirato quando comparada com a dieta controle sendo esta última menos atraente para os camarões. As demais dietas não apresentaram diferenças entre elas indicando que os aditivos não diminuíram a atratividade da ração.

Diversos trabalhos relatam que ácidos orgânicos e probióticos podem melhorar os parâmetros zootécnicos por meio do aumento de atividade de enzimas digestivas (Wang, 2007, Zhou et al., 2009), melhorando a digestão de macro e micro nutrientes (Hossain et al., 2007; Lin et al., 2004), a digestibilidade de proteínas (Buglione et al., 2013; Lückstädt, 2008) consequentemente melhorando a conversão alimentar e taxa de crescimento específica (Kongnum e Hongpattarakere, 2012; Romano et al., 2015). Em camarões *L. vannamei* alimentados tanto com sais orgânicos (propionato e butirato

de sódio) como com a bactéria probiótica *L. plantarum*, foram obtidos melhores resultados no peso final, na eficiência alimentar e na sobrevivência comparados com o grupo controle (Kongnum e Hongpattarakere, 2012; Silva et al., 2014). No presente trabalho não foi observado o mesmo comportamento podendo ser devido os camarões não terem sofrido nenhum estresse por densidade ou qualidade de água em função do sistema de água clara, fornecendo condições ideais de crescimento.

Os camarões que receberam probiótico na dieta apresentaram maiores contagens de colônias de bactérias ácido lácticas no intestino que os grupos que não receberam probiótico, provando que a bactéria probiótica consegue permanecer na ração e chegar ao intestino do camarão por meio da ingestão do alimento. Estudos similares com *L. vannamei* suplementados com *L. plantarum* também mostram que foi possível modificar a microbiota intestinal aumentando a concentração da bactérias ácido lácticas e consequentemente diminuindo as concentrações de vibrio (Vieira et al., 2010). Adicionalmente, um estudo em *L. stylirostris* relata que a bactéria ácido láctica *Pediococcus acidilactici* também foi capaz de alterar a microbiota do camarão diminuindo as concentrações de *Vibrio* spp. e de bactérias heterotróficas totais no intestino (Castex et al., 2008). Apesar de não terem sido observadas diferenças nas contagens de *Vibrio* spp. e de bactérias heterotróficas totais entre os tratamentos, as bactérias ácido lácticas são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos diminuindo o pH do seu meio ambiente, por competição de nutrientes e sítios de adesão e por produção de compostos antimicrobianos (Gatesoupe, 2008). Por outro lado, os ácidos orgânicos (ou seus sais) além de diminuir o pH do seu entorno são capazes de produzir complexos quelantes com minerais, inibindo o crescimento de bactérias como as do gênero *Vibrio* (Cardoso e Nogueira, 2007; Whitaker et al., 2010). Estudos mostram que em camarões *L. vannamei* sais orgânicos diminuíram a concentração de *Vibrios* spp. tanto no hepatopâncreas como no intestino (Silva et al., 2013, 2014; Romano et al., 2015).

No presente trabalho não foi possível encontrar interações entre os tratamentos para os parâmetros imunológicos analisados, contudo é sabido que os probióticos são geralmente capazes de estimular o sistema imune não específico do hospedeiro incrementando a resistência frente às enfermidades (Magnadóttir, et al. 2006). Na infecção com *V. alginolyticus* os camarões alimentados com dietas suplementadas com o butirato de sódio e/ou o probiótico, mostraram maior resistência que os camarões do grupo controle. *L. plantarum* também demonstrou ser

benéfica para o *L. vannamei* aumentando a resposta imune humoral e celular após desafio com *V. alginolyticus* (Chiu et al., 2007) e aumentando a sobrevivência após infecção com *V. harveyi* (Vieira et al. 2007, 2010). Igualmente sais orgânicos demonstraram aumentar a sobrevivência de camarões após desafios com *V. harveyi* (Romano et al., 2015), e em tilápias alimentadas com 0,5% de diformiato de potássio (KDF) após desafio com *Vibrio anguillarum* (Ramli et al., 2005). Dietas com 0.3% de KDF também ajudaram a diminuir as mortalidades em tilápias ao serem desafiadas com *Streptococcus agalactiae* (Ng et al., 2009).

Uma das respostas de defesa mais importantes do sistema humoral inato do camarão é a atividade da PO. Nos resultados obtidos no presente trabalho a atividade da PO foi maior nos tratamentos quando comparados com o grupo controle, e a pesar de não obter diferenças estatísticas, essa atividade numericamente maior pode ter ajudado na resistência frente à infecção com o patógeno. No entanto, o uso combinado de probiótico e sal orgânico não interferiu na sobrevivência frente a infecção, contrastando com um trabalho em aves alimentadas com ácidos orgânicos e probióticos onde os animais apresentaram melhores respostas que os tratamentos individuais frente à infecção com *S. enteritidis* (Wolfenden et al., 2007).

## 21. Conclusões

- a) O uso de *L. plantarum* e butirato de sódio na ração não altera sua atratividade.
- b) A adição do probiótico *L. plantarum* na dieta aumentam as contagens de bactérias ácido lácticas no intestino do camarão *L. vannamei*, contudo sem alterar as contagens de *Vibrio* spp e bactérias heterotróficas totais no intestino.
- c) O butirato de sódio e o *L. plantarum* aumentam a resistência do *L. vannamei* ao desafio com *V. alginolyticus*, contudo, sem alterar os parâmetros zootécnicos e imunológicos dos camarões em sistema de engorda em água clara.

## 22. Referencias

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.

BOYD, C. E., GAUTIER, D. Effluent composition and water quality standards. **Global Aquaculture Advocate**, v. 3, p. 61–66, 2000.

BUGLIONE-NETO, C. et al. Methods for determining the apparent digestibility of diets for marine shrimp supplemented with probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1021-1027, 2013.

CARDOSO, E.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, p. 79, 2007.

CASTEX, M. et al. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. **Aquaculture**, v. 275, n. 1, p. 182-193, 2008.

CASTEX, M. et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish Shellfish Immunol**, v. 28, n. 4, p. 622-31, Apr 2010.

CHIU, C. H. et al. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 23, n. 2, p. 364-77, Aug 2007.

COSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 1, p. 218-223, 2005.

DA SILVA, B. C. et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384, p. 104-110, 2013.

DEFOIRD, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 251-8, Jun 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Rome: SOFIA, 2012, 209p

FAO (2015) **Fisheries Global Information System**. Disponível em <<http://www.fao.org/fishery/figis/en>>. Acesso em 11 de Junho 2015.

GATESOUBE, F. J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of**

**molecular microbiology and biotechnology**, v. 14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.

GRAM, L. et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 969-973, Mar 1999.

GRASLUND, S.; HOLMSTROM, K.; WAHLSTROM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. **Mar Pollut Bull**, v. 46, n. 1, p. 81-90, Jan 2003.

HAMER, H. M. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008.

HOSSAIN, M. A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries science**, v. 73, n. 6, p. 1309-1317, 2007.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. **Plant and soil**, v. 205, n. 1, p. 25-44, 1998.

KITIYODOM, S. et al. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). **FEMS microbiology ecology**, v. 72, n. 2, p. 219-227, 2010.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 32, n. 1, p. 170-7, Jan 2012.

LAFFERTY, K. D. et al. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. **Annual Review of Marine Science**, Vol 7, v. 7, p. 471-496, 2015.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **J Invertebr Pathol**, v. 106, n. 1, p. 110-30, Jan 2011.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **J Invertebr Pathol**, v. 110, n. 2, p. 174-83, Jun 2012.

LIN, H. Z. et al. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 15, p. 1441-1447, 2004.

LUCKSTADT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources**, v. 3, p. 1-8, 2008.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & shellfish immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.

MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-7, 2011.

NG, W.-K. et al. Organic Acids Potential Replacement For Antibiotic Treatments Of Tilapia. **Global aquaculture advocate**, 2009.

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutr Res Rev**, v. 12, n. 1, p. 117-45, Jun 1999.

PATEL, M.; ISAÄCSON, M.; GOUWS, E. Effect of iron and pH on the survival of *Vibrio cholerae* in water. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 175-177, 1995.

RAMLI, N. H., U.; SUNANTO, S. Effect of potassium-diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. **World Aquaculture Society**, Bali, Indonesia, p. 9-13, 2005.

ROBLES, R. et al. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1567-1580, 2013.

ROMANO, N.; KOH, C.-B.; NG, W.-K. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 435, p. 228-236, 2015.

SILVA, B. C. et al. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, 2014.



SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99-104, 1984.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Dis Aquat Organ**, v. 105, n. 45, p. e55, 2013.

VIEIRA, F. D. N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 763-769, 2008.

VIEIRA, F. D. N. et al. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 998-1004, 2013.

VIEIRA, F. D. N. et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, p. 251-255, 2007.

VIEIRA, F. N. et al. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 631-638, 2010.

WANG, Y.-B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1, p. 259-264, 2007.

WHITAKER, W. B. et al. Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4720-4729, 2010.

WOLFENDEN, A. et al. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **Int. J. Poultry Sci**, v. 6, p. 403-405, 2007.

XIE, S.; ZHANG, L.; WANG, D. Effects of several organic acids on the feeding behavior of *Tilapia nilotica*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. 255-257, 2003.

ZHANG, W. H. et al. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. **British poultry science**, v. 52, n. 3, p. 292-301, 2011.

ZHOU, X.-X.; WANG, Y.-B.; LI, W.-F. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3, p. 349-353, 2009.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2, p. 516-524, 2006.

### 23. CONCLUSOES GERAIS

Sais como citrato e formiato de sódio inibem o crescimento de *L. plantarum*. O crescimento de *L. Plantarum* pode ser estimulado pela adição de glutamato, fumarato ou succinato de sódio aumentando sua velocidade de crescimento e concentração. Sais como o propionato e butirato de sódio não interferem no crescimento do probiótico.

Os melhores sais na inibição *in vitro* contra *V. alginolyticus* foram o butirato, acetato e propionato de sódio. Para *A. hydrophila*, *E coli* e *P. aeruginosa* o propionato de sódio obteve os melhores resultados e contra o *S. agalactiae* o fumarato de sódio foi o sal mais efetivo.

O uso de sais orgânicos em conjunto com *L. plantarum* aumenta o poder inibitório *in vitro* frente a *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *E coli*, *P. aeruginosa* e *S. agalactiae*

A inclusão de butirato de sódio e *L. plantarum* na ração de *L. vannamei* não altera sua atratividade.

Camarões que receberam o probiótico *L. plantarum* na dieta tiveram maiores contagens de bactérias ácido lácticas totais comparados com os tratamentos que não receberam probiótico. O butirato de sódio e *L. plantarum* aumentam a resistência de *L. vannamei* frente à infecção com *V. alginolyticus*, contudo, sem alteração dos parâmetros zootécnicos, dos parâmetros imunológicos e das contagens de *Vibrio* spp e bactérias heterotróficas totais no intestino.



## 24. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABBASS, A.; SHARIFUZZAMAN, S. M.; AUSTIN, B. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 1, p. 31-37, 2010.

ADAMS, D.; BOOPATHY, R. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. **Biologia**, v. 68, n. 6, p. 1017-1021, 2013.

AKHTER, N. et al. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 2, p. 733-741, 2015.

ALY, S. M. et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1, p. 128-136, 2008.

APÚN-MOLINA, J. P. et al. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 8, p. 887-894, 2009.

BALCÁZAR, J. L. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report. **National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador**, 2003.

BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary microbiology**, v. 114, n. 3, p. 173-186, 2006.

BALCÁZAR, J. L. et al. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3-4, p. 373-380, 2007a.

BALCÁZAR, J. L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, D. P. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 147-150, 2007b.

BALCÁZAR, J. L. et al. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, n. 1, p. 188-191, 2008.

BARRACO, M.A.; PERAZZOLOM L.M.; ROSA, R.D. Inmunología de crustáceos, con énfasis en camarones. In: MORALES V. **Patología e inmunología del camarón blanco *Pennaeus vannamei***, Panamá: CYTED, 2008.

BARUAH, K. et al. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 2, p. 109-120, 2007.

BERGER, C. 2000. **Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmuno-estimulación de camarones pendidos**. In: Cruz – Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds). **Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. p. 19-22, 2000. Mérida, Yucatán.

BOLÍVAR RAMÍREZ, N. et al. Prebiotic, probiotic, and symbiotic-supplemented diet for marine shrimp farming. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 913-919, 2013.

CALLAWAY, T. R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. Special Issue 02, p. 217-225, 2008.

CARDOSO, E.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, p. 79, 2007.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASTEX, M. et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish Shellfish Immunol**, v. 28, n. 4, p. 622-31, Apr 2010.

CASTILLO, S. et al. Effects of organic acids on growth performance

and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, v. 433, p. 6-12, 2014.

CHIU, C. H. et al. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 364-377, Aug 2007.

CHYTHANYA, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. **Aquaculture**, v. 208, n. 1-2, p. 1-10, 5/31/ 2002.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DE SCHRYVER, P. et al. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1535-1541, 2010.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W.; LAVENS, P. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 4, p. 334-338, 2008.

DEFOIRDT, T. et al. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. **Aquaculture**, v. 261, n. 2, p. 804-808, 2006.

DEFOIRDT, T. et al. Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 680-685, 2009.

DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 251-258, Jun 2011.

DOBSON, A. et al. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, Jan 2012.

EL-HAROUN, E. R.; GODA, A. S.; CHOWDHURY, K. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473-1480, 2006.

ESCOBAR-BRIONES, L.; OLVERA-NOVOA, M. A.; PUERTO-CASTILLO, C. Avances sobre la Ecología Microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. **Avances de Nutrición acuícola. VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola**, p. 15-17, 2006.

FAO/WHO, Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Rome: SOFIA, 2012, 209p

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Rome: SOFIA, 2014, 223 p.

FAO (2015) **Fisheries Global InformationSystem**. Disponível em <<http://www.fao.org/fishery/figis/en>>. Acesso em 11 de Junio 2015.

FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 149-158, Nov 2006.

FERREIRA, G. S. et al. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 448, p. 273-279, 2015.

FJELLHEIM, A. J. et al. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Veterinary microbiology**, v. 144, n. 1, p. 153-159, 2010.

FRANCO, L. D. et al. Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)**, v. 89, n. 3-6, p. 88-93, Apr-Jun 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: (Ed.). **Probiotics**: Springer, 1992. p.1-8



GARRIQUES, D.; AREVALO, G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. 1995. p.53-59.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, Oct 1 1999.

GATESOUBE, F. J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.

GIBSON, L. F.; WOODWORTH, J.; GEORGE, A. M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. **Aquaculture**, v. 169, n. 1, p. 111-120, 1998.

GIRI, S. S.; SEN, S. S.; SUKUMARAN, V. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1135-1140, 6// 2012.

GRAM, L. et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 969-973, Mar 1999.

GRASLUND, S.; HOLMSTROM, K.; WAHSTROM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 81-90, Jan 2003.

GUNASEKARA, R. A. Y. S. A. et al. Evaluation of probiotic effect of *Aeromonas hydrophila* on the development of the digestive tract of germ-free *Artemia franciscana* nauplii. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 393, n. 1-2, p. 78-82, 9/30/ 2010.

HOSSAIN, M. A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries science**, v. 73, n. 6, p. 1309-1317, 2007.

IBA, A. M.; BERCHIERI, A., JR. Studies on the use of a formic acid-propionic acid mixture (Bio-add) to control experimental Salmonella

infection in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 24, n. 2, p. 303-11, Jun 1995.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 6, p. 333-342, 2002.

JOHANSSON, M. W.; SODERHALL, K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Parasitology Today**, v. 5, n. 6, p. 171-176, 1989.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. **Plant and soil**, v. 205, n. 1, p. 25-44, 1998.

KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 145-161, Nov 20 2000.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). **Aquaculture**, v. 344–349, p. 29-34, 5/21/2012.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 1, p. 170-177, 2012.

KÜHLMANN, K. J.; JINTASATAPORN, O.; LÜCKSTÄDT, C. Effect of dietary potassium diformate (KDF) on survival of juvenile white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, challenged with *Vibrio harveyi* under controlled conditions. **Book of Abstracts, VIII Meeting of the German Ichthyological Association**, p.41. 2011a.

KÜHLMANN, K. J.; JINTASATAPORN, O.; LÜCKSTÄDT, C. Dietary potassium-diformate (KDF) improves growth performance of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under controlled conditions. **International Aquafeed**, p. 19-22, 2011b.

KUNG JR, L. et al. The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the

fermentation of high moisture corn and whole-crop barley. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 5, p. 1310-1316, 2004.

LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 193-201, 2/10/ 2003.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110-130, Jan 2011.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174-183, Jun 2012.

LIU, H. et al. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 41, n. 2, p. 300-307, 2014.

LUCKSTADTS, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources**, v. 3, p. 1-8, 2008.

MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-7, 2011.

MORIARTY, D. J. W. "Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria." Microbial bioassays: New frontiers. Proceedings of the **Eighth International Symposium on Microbial Ecology**. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. 1999.

MORKEN, T. et al. Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 317, n. 1, p. 138-145, 2011.

MUÑOZ-ATIENZA, E. et al. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 15, 2013.

‘NG, W.-K. et al. Organic Acids Potential Replacement For Antibiotic Treatments Of Tilapia. **Global aquaculture advocate**, 2009.

NG, W.-K. et al. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. **Aquaculture**, 2015.

OCHOA-SOLANO, J. L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of Bacillus for shrimp feeds. **Food microbiology**, v. 23, n. 6, p. 519-525, 2006.

PAI, S. S. et al. *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 6, p. 847-860, 2010.

PANIGRAHI, A. et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 102, n. 4, p. 379-388, 2004.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, pp. 4–8, 1974

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 117-45, Jun 1999.

PATEL, A. K. et al. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of Bacillus spp. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 368-373, 1// 2009.

PATTUKUMAR, V. et al. Enhancement of innate immune system, survival and yield in *Penaeus monodon* reared in ponds using *Streptococcus phocae* PI80. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 5, p. 505-513, 2014.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T. et al. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 2, p. 196-201, 2011.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T. et al. Probiotics in aquaculture: a current assessment. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 3, p. 133-146, 2014.

PIRARAT, N. et al. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 113, n. 3, p. 339-347, 2006.

PRIEUR, D. et al. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 28, p. 277-352, 1990.

RAHIMAN, K. M., et al. Probiotic effect of Bacillus NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v. 41, n. 9, 120-134, 2010.

RINGO, E.; GATESOUBE, F. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, n. 3-4, p. 177-203, Jan 30 1998.

RODRÍGUEZ, J. et al. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 405-415, 2007.

ROMANO, N.; KOH, C.-B.; NG, W.-K. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 435, p. 228-236, 2015.

SAKATA, T. Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish. In: Lésel, R. (Ed.), **Microbiology in Poecilotheims**. Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 171-176.

SALMINEN, S. et al. Lactic acid bacteria in health and disease. **Lactic acid bacteria**, p. 199-225, 1993.

SALYERS AA, WHITE DD. **Bacterial pathogenesis, a molecular approach**. ASM Press. Washington D.C. USA, 2002, pp. 47-

SANZ, Y.; DE PALMA, G. Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function.

**International reviews of immunology**, v. 28, n.6, p. 397-413, 2009.

SARKER, S. A.; SATOH, S.; KIRON, V. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 248, n. 1, p. 3-11, 2005.

SHARIFUZZAMAN, S. M.; AUSTIN, B. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n. 3, p. 440-445, 2009.

SILVA, B. C. et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384, p. 104-110, 2013.

SILVA, B. C. et al. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, 2014.

SILVA, B. C., et al. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. **Aquaculture Nutrition**, 2015.

SMITH, P.; DAVEY, S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, n. 5, 521-524, 1993.

SONG, Z. F. et al. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. **Aquaculture**, v. 319, n. 1, p. 188-193, 2011.

STRÖM-BESTOR, M.; WIKLUND, T. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, in vitro. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 4, p. 255-264, 2011.

SU, X. et al. The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. **Aquaculture International**, v. 22, n. 6, p. 1823-1835, 2014.

SUGITA, H. et al. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**, v. 165, n. 3-4, p. 269-280, 1998.

SUGITA, H.; MIYAJIMA, C.; DEGUCHI, Y. The vitamin B12-producing ability of intestinal bacteria isolated from Tilapia and channel catfish. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 56, n. 4, 1990.

SUGITA, H., MIYAJIMA C., DEGUCHI Y. The vitamin B 12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. **Aquaculture**, v. 92, p. 267-276, 1991.

THOMPSON, J. et al. An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1177-1187, 2010.

TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, 45-55, 2013.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in applied microbiology**, v. 36, n. 2, p. 83-87, 2003.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, 245, 149-161

VELMURUGAN, S. et al. Bacterial white patch disease caused by *Bacillus cereus*, a new emerging disease in semi-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 444, p. 49-54, 2015.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655, Dec 2000.

VIEIRA, F. D. N. et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, p. 251-255, 2007.

VIEIRA, F. N. et al. Effect of probiotic supplemented diet on marine

shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 631-638, 2010.

VINE, N. G. et al. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of fish diseases**, v. 27, n. 6, p. 319-326, 2004.

WANG, Y.-B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1, p. 259-264, 2007.

WANG, Y. G. et al. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. **Diseases of aquatic organisms**, v. 41, n. 1, p. 9-18, 2000.

SALYERS A.A, WHITE D.D. **Bacterial pathogenesis, a molecular approach**. ASM Press. Washington D. C. 2002

WOLFENDEN, A. et al. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 403-405, 2007.

YU, M.-C. et al. Effects of dietary medicinal herbs and Bacillus on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture International**, v. 17, n. 4, p. 377-384, 2009.

ZAPATA, A. A.; LARA-FLORES, M. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Nile Tilapia intestine (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Biology and Life Science**, v. 4, n. 1, 2013.

ZHOU, X.-X.; WANG, Y.-B.; LI, W.-F. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3, p. 349-353, 2009.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2, p. 516-524, 2006.