

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
LABORATÓRIO DE AQUICULTURA

RELATÓRIO FINAL

Eficácia da adição de imunostimulante na ração de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)
submetidos a desafio bacteriano com *Edwardsiella tarda*.

Voluntária: Tatiane Oliveira da Silva

MANAUS/AM

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
LABORATÓRIO DE AQUICULTURA

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-A/0085/2011

Eficácia da adição de imunoestimulante na ração de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)
submetidos a desafio bacteriano com *Edwardsiella tarda*

Voluntária: Tatiane Oliveira da Silva

Orientador: Profª Drª Christiane Patrícia Feitosa de Oliveira

MANAUS/AM

2012

Sumário

1. Introdução	4
2. Revisão de literatura	6
2.1 A Aquicultura no Brasil	6
2.2 A espécie Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	6
2.3 A bactéria <i>Edwardsiella tarda</i>	7
2.4 Imunoestimulantes em aquicultura	8
3. Objetivos	9
3.1 Geral	9
3.2 Específico	10
4. Materiais e Métodos	10
4.1 Aquisição e Aclimação dos animais	10
4.2 Desafio bacteriano	11
4.3 Monitoramento da qualidade da água	11
4.4 Parâmetros Sanguíneos e Metabólicos	11
4.5 Análises microbiológicas	12
4.6 Análise estatística	13
5. Resultados e Discussão	14
5.1. Análises sanguíneas e metabólicas	14
5.2. Análises microbiológicas	17
6. Considerações	18
7. Referências Bibliográficas	19

RESUMO

Na Região Norte do Brasil, o tambaqui é a espécie mais explorada comercialmente, representando mais de 40% de todo o pescado comercializado na cidade de Manaus. Um dos principais problemas relacionados à criação dessa espécie é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas. O estabelecimento de métodos que melhorem as condições de sanidade dos peixes cultivados e contribuam para prevenir a ocorrência de doenças é de suma importância para o desenvolvimento da piscicultura intensiva. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar a eficácia da adição de imunoestimulante na ração de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a desafio bacteriano com *Edwardsiella tarda*. No experimento os peixes foram distribuídos em um delineamento completamente casualizado, com dois tratamentos em aquários de 40L e cada unidade experimental com 12 peixes. Um grupo de peixes foi alimentado com ração comercial 40% de proteína bruta sem adição do imunoestimulante (grupo controle) e outro grupo recebeu ração acrescida de 5,0mg AquaVac Ergosan®/Kg de ração, com arrazoamento ad libitum, 2 vezes ao dia (manhã e tarde), o imunoestimulante foi incorporado à ração comercial com o auxílio de pectina. Após 60 dias os peixes foram expostos à bactéria *Edwardsiella tarda* por meio de banho, em uma concentração de $38,66 \times 10^{-6}$ UFC. Durante quinze dias após o desafio bacteriano os animais permaneceram íntegros e mantiveram atividade metabólica estável, houve 100% de sobrevivência dos peixes tanto do grupo controle quanto do grupo do imunoestimulante. Assim como também não houve sinais compatíveis com a forma septicêmica da doença causada pela bactéria e nem sinais de distúrbios hematológicos e metabólicos.

1. Introdução

A produção animal vem experimentando avanços tecnológicos nas áreas de melhoramento genético, biotecnologia, sanidade e nutrição. As atividades aquícolas apresentam um crescimento significativo no fornecimento de proteína animal para o consumo humano (QUEIROZ *et al.*, 2005). A criação de espécies nativas também tem crescido nos últimos anos. Na Amazônia a piscicultura é voltada para criação de espécies que possuem alto valor comercial, como é o caso do tambaqui (SUFRAMA, 2003).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie mais cultivada na região Norte e seu cultivo tem se expandido entre as regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do país. O sucesso na criação desta espécie deve-se ao seu excelente potencial para produção intensiva, por aceitar alimentação artificial e por possuir uma técnica de reprodução artificial já consolidada. Entretanto, devido ao confinamento, ao manejo inadequado e as altas taxas de estocagem, a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas é um dos problemas relacionados à sua produção (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). As doenças causam prejuízos que podem tornar a atividade onerosa e pouco lucrativa para os piscicultores, devido à mortalidade excessiva durante surtos de infecção (TAVECHIO *et al.*, 2009).

Na profilaxia e tratamento de infecções bacterianas são utilizados antibióticos como a oxitetraciclina. Esses produtos apresentam efeito tóxico às brânquias, a pele e ao fígado, e podem acumular resíduos na musculatura, oferecendo risco potencial ao consumidor, caso não sejam respeitados os tempos de carência pós-tratamento. Adicionalmente, aumentam significativamente o impacto ambiental no entorno da piscicultura onde os resíduos e águas dos tratamentos são descartadas. Ressalta-se que a utilização de produtos químicos deve ser regida por legislação específica e que no Brasil, poucos produtos são registrados para uso em aquicultura (TAVECHIO *et al.*, 2009). O uso de imunoestimulantes na alimentação dos peixes tem sido utilizado como uma alternativa na profilaxia e no tratamento de infecções bacterianas (SAKAI, 1999).

Os imunoestimulantes são considerados substâncias biológicas que auxiliam benéficamente os mecanismos específicos e não específicos de defesa dos animais (VERLHAC *et al.*, 1998; RAA, 2000; VAINIKKA *et al.*, 2005; CHAGAS *et al.*, 2009). O emprego dessas substâncias na dieta dos peixes favorece as respostas orgânicas de defesa frente às infecções (VERLHAC *et al.*, 1998; SAKAI, 1999; RAA, 2000; AMAR *et al.*, 2001; VAINIKKA *et*

al., 2005). Portanto, a melhora na condição imune do organismo por manipulação dietética representa alternativa ao uso de drogas na aquicultura.

2. Revisão de literatura

2.1 A Aquicultura no Brasil

A aquicultura no Brasil vem se desenvolvendo sem muita ostentação, se comparada com outros países do mundo, onde a atividade ocupa um lugar de destaque. O Brasil ocupa a décima sexta posição mundial entre os produtores de pescado cultivado (MPA, 2010). A aquicultura continental tem sido um dos setores do país que mais tem crescido nos últimos anos, em 2009 passou a responder por 27% da produção nacional (MPA, 2010).

O Brasil apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento das mais diversas modalidades de aquicultura, por possuir um grande potencial hídrico, proveniente das bacias hidrográficas, das inúmeras represas espalhadas por todo país e da sua produtiva região costeira. Além de possuir uma grande riqueza de espécies, diversos microclimas. Também deve se levar em consideração que o Brasil é um país essencialmente agrícola, e que apresenta grande disponibilidade de produtos e subprodutos que podem ser utilizados na fabricação de rações a um custo relativamente baixo (CAMARGO & POUHEY, 2005).

2.2 A espécie Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

A espécie *Colossoma macropomum*, conhecida como tambaqui pertence à ordem Characiformes e família Serrasalmidæ. É nativo das bacias do Amazonas e Orinoco. É uma espécie de alto valor comercial, muito apreciada pela população local. Na criação em cativeiro, não tem problemas em aceitar ração comercial, é uma espécie rústica, e de fácil manuseio. O tambaqui apresenta grande facilidade de obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento e alta produtividade, bem como a aceitação pela população humana, destacando-se como uma das espécies de peixes mais importantes para a economia regional (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998).

É uma das espécies mais encontradas nos cultivos da América do Sul, e que vem sendo cultivada intensivamente em muitos países como o Brasil, Venezuela e Colômbia. Apesar do seu cultivo intensivo, as suas doenças ainda são pouco estudadas. A maioria dos registros existentes é proveniente de cultivos semi-intensivos em viveiros, tanques e barragens (BERMUDEZ, 1980).

Na Região Norte do Brasil, é a espécie mais explorada comercialmente (VAL et al., 2000), representando mais de 40% de todo o pescado comercializado na cidade de Manaus (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). A demanda de tambaqui é incessante, indicando grande potencialidade para aumentar a renda do produtor rural, através do cultivo desta espécie em cativeiro.

Um dos principais problemas relacionados à criação dessa espécie é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). Com relação a doenças bacterianas, já foram registrada a ocorrência de 22 espécies de bactérias na criação de tambaqui. O estabelecimento de métodos que melhorem as condições de sanidade dos peixes cultivados e contribuam para prevenir a ocorrência de doenças é de suma importância para o desenvolvimento da atividade (WEDEMEYER, 1996).

2.3 A bactéria *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella tarda tem sido considerada como bactéria emergente para enfermidades transmitidas através de alimentos (DOYLE, 1989). São bastonetes Gram negativos curtos (1µm de diâmetro e com comprimento de 2 a 3 µm), pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos, mesófilos. É considerada uma bactéria comum da microbiota intestinal de animais aquáticos sendo, frequentemente, isolada do trato digestório de carpas, bagres, tilápias e outros peixes de criação, além de cobras, rãs, tartarugas e aves, inclusive de fezes humanas (WYATT; NICKELSON; VANDERZANT, 1979; COSTA, 2004). Foi descrita na África, América do Norte e Ásia (KINKELIN, MICHEL e GHITTINO, 1991). É patogênica para peixes, podendo causar lesões na pele e vísceras, principalmente no verão, quando o ambiente hídrico na região tropical apresenta temperaturas médias de 30°C (NOGA, 1996; PAVANELLI et al., 1998). Condições de estresse também podem desencadear sintomas de septicemia dos peixes tropicais (NOGA, 1996; PAVANELLI et al., 1998).

De acordo com Pavanelli; Eiras e Takemoto (2002), a *E. tarda* pode estar presente no sedimento e na água dos tanques de criação e se manifesta especialmente quando há grande quantidade de matéria orgânica na água e os hospedeiros estão em situação de estresse. As espécies mais acometidas são peixes de água quente, como o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), dourado (*Salminus sp.*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

A enfermidade causada pela *E. tarda* em peixes é conhecida como “septicemia dos peixes tropicais”, apresentando sintomas tais como: lesões hemorrágicas cutâneas que podem

evoluir para abscessos com tecido necrótico e odor desagradável, despigmentação cutânea, nódulos nas brânquias (PASTOR, 1981; NOGA, 1996; PAVANELLI et al., 1998), hiperplasia epitelial, necrose de linha lateral e opacidade de córnea (NOGA, 1996). Na forma septicêmica ocorrem ascite, distensão da cavidade celomática, exoftalmia, prolapso anal e nódulos brancos no fígado, rins e baço (PAVANELLI et al., 1998).

A fonte e a transmissão dessa bactéria durante surtos em peixes é incerta, embora se saiba que permaneça nos tecidos por períodos desconhecidos (WINSOR, BLOEBAUM e MATHEWSON, 1981). Bernoth (1991) classifica *E. tarda* como patógenos potenciais transmitidas ao homem por peixes de água doce, que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos.

Como se encontra normalmente na água e na superfície dos hospedeiros, e se manifesta em condições desfavoráveis, o melhor método profilático consiste em evitar o estresse dos peixes de cultivo, mantendo-os em baixas densidades populacionais e evitando o acúmulo de matéria orgânica na água (NOGA, 1996; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002).

2.4 Imunoestimulantes em aquicultura

Muitas doenças de peixes estão ligadas ao estresse ocasionado pelo ambiente de cultivo. O sistema imunológico dos peixes diretamente recebe a influencia de fatores externos/ambientais. As condições nutricionais se encaixam no papel mais importante sobre o sistema imune. Esse sistema desempenha o importante papel de defesa do organismo contra a invasão e estabelecimento de muitas doenças. Estimular o sistema de defesa de animais mantidos em um ambiente estressante é uma alternativa eficiente e necessária (DÜGENCI *et al.*, 2003).

Imunoestimulantes podem desempenhar um papel importante na aquicultura onde a sua utilização inclui a melhoria da resposta imune não específica a uma gama de agentes patogênicos e reforçar a resposta imunitária em animais. Portanto conceitua-se imunoestimulante como a substância que aumenta a atividade do sistema imune por meio da interação direta entre as células do sistema. As principais respostas são o aumento da atividade do macrófago, fagocitose por neutrófilo e monócito, maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e lisozima (RAA, 1996; SAKAI, 1999). Além disso, o tratamento preventivo com imunoestimulantes naturais evita os problemas de resistência microbiológica, acúmulo de resíduos químicos nos animais e poluição ambiental causada pelo uso indiscriminado de antibióticos e outras substâncias químicas.

A administração de imunostimulantes para peixes através da dieta tem aparecido como medida de controle muito promissor em pisciculturas (GATESOUBE, 1999). A indústria aquícola, com o passar dos anos, vem aumentando o interesse sobre o uso de imunostimulantes, tanto como medida profilática quanto para diminuir os efeitos secundários causados pelo estresse devido à condição intensiva de produção. Os imunostimulantes, adicionados a ração de maneira profilática, podem beneficiar a aquicultura, principalmente nas fases iniciais do cultivo, quando os peixes estão mais suscetíveis a doenças (PORTZ, 2006).

A implementação de imunostimulantes na ração é uma das técnicas que visa aumentar a resistência imunológica de animais cultivados através da alimentação. Ela fornece nutrientes essenciais que atuam diretamente no sistema imunitário conferindo resistência ao estresse do confinamento, às mudanças na qualidade da água e as doenças (TAVECHIO *et al.*, 2009).

Dentre os imunostimulantes disponíveis e comercializados no mercado tem-se o AquaVac Ergosan®. O AquaVac Ergosan® é um complemento alimentar natural à base das macroalgas marinhas *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum* (SCHERING-PLOUGH Animal Health Corp, 2009). Apresenta efeito positivo para tolerância ao stress de manejo e na resposta a vacinação em trutas *Oncorhynchus mykiss* (GIOACCHINI *et al.*, 2008). Não possui qualquer contra indicação, podendo ser administrado aos peixes nas mais diferentes fases de criação. Os ingredientes ativos incluem algines especiais e polissacarídeos conhecidos para reforçar a gama completa de sistemas de defesa natural em peixes.

Foram realizados estudos sobre os peixes sendo alimentados com AquaVac Ergosan® em sua dieta normal e estes têm demonstrado diminuição da sensibilidade ao estresse de temperatura, aumento da produção de proteínas de choque térmico em momentos de alta tensão e uma recuperação mais rápida a partir de reações de estresse (CARNEVALI *et al.* 2006). Diversos trabalhos relatam a eficácia do Ergosan no sistema imune dos peixes e nas respostas de defesa frente a infecções bacterianas (PEDDIE *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004; BAGNI *et al.*, 2005; BRICKNELL & DALMO, 2005).

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a eficiência da adição de imunostimulante na ração de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a desafio bacteriano.

3.2 Específico

a) Avaliar as respostas sanguíneas e metabólicas de tambaqui alimentados com o imunostimulante Aquavac Ergosan® e submetidos a desafio bacteriano com *Edwardsiella tarda*.

b) Avaliar a incidência de infecções na pele, fígado e baço de exemplares de Tambaqui alimentados com o imunostimulante Aquavac Ergosan® e submetidos a desafio bacteriano experimental.

4. Materiais e Métodos

4.1 Aquisição e Aclimação dos animais

O experimento foi realizado utilizando-se 48 juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), adquiridos com valores iniciais médios de peso de $15,8 \pm 0,3$ g e comprimento padrão de $8,3 \pm 0,1$ cm, provenientes da fazenda Águas Claras, Km 64, AM – 010 e transportados ao Laboratório Contêiner-Aquário da UFAM, situado no Setor de Produção Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias, onde permaneceram por um mês em processo de aclimação. Os peixes foram distribuídos em um delineamento completamente casualizado, com dois tratamentos e duas repetições, em 4 aquários de 40L e cada unidade experimental com 12 peixes.

Os aquários foram equipados com sistema de circulação constante da água e com sistema de aeração composto de pedras microporosas ligadas por mangueiras de silicone a compressores de ar. Diariamente, os aquários foram sifonados durante a manhã para a retirada das fezes e dos restos de ração até o final do período experimental. A água utilizada no experimento foi proveniente de poço com distribuição por gravidade com água previamente descansada em reservatório. A temperatura da água foi aferida diariamente pela manhã, assim como o oxigênio dissolvido e pH. Durante o período de aclimação foi fornecida ração comercial com 40% de proteína bruta. Passado o período de aclimação, foram iniciados os experimentos de alimentação com o imunostimulante AquaVac Ergosan® e após 60 dias foi realizado o desafio bacteriano. Para isso um grupo de peixes foi alimentado com ração comercial 40% de proteína bruta sem adição do imunostimulante (grupo controle) e outro grupo recebeu ração acrescida de 5,0mg AquaVac Ergosan®/Kg de ração, com arraçoamento *ad libitum*, 2 vezes ao dia, (manhã e tarde), o imunostimulante foi incorporado à ração

comercial com o auxílio de pectina, e como fator de correção a pectina foi também incorporada a ração distribuída para o grupo controle.

4.2 Desafio bacteriano

Após 60 dias de suplementação alimentar com o imunoestimulante, foi realizado o desafio bacteriano. O agente infectante, a cepa de bactéria *Edwardsiella tarda* (*type strain*), utilizada no desafio dos tambaquis foi fornecida pela Coleção de Culturas de Bactérias Patogênicas de Peixes, mantida no Centro de Apoio Multidisciplinas – CAM, da Universidade Federal do Amazonas. A cepa foi armazenada à -4°C até o seu uso. Para o desafio, o inóculo foi preparado através da inoculação da cepa bacteriana em caldo de crescimento (Nutri Broth) e incubação por 24 horas em shaker à 143RPM e 30°C.

Os peixes foram expostos à bactéria por meio de banho, em uma concentração de $38,66 \times 10^{-6}$ UFC durante 20 minutos, sem renovação de água. Após este período, foi retomada a renovação de água nos aquários e os peixes observados, diariamente, durante 15 dias, para verificação de manifestações clínicas ocasionadas pela bactéria, tais como: ascite, distensão da cavidade abdominal, exoftalmia, pequenas lesões cutâneas, que podem originar abscessos, entre outras (PAVANELLI et al., 2002). Também foram feitas observações de alterações comportamentais e mortalidade.

4.3 Monitoramento da qualidade da água

Durante todo o período experimental foi realizado o monitoramento das características físico-químicas da água nas unidades experimentais. A temperatura foi de $26,4 \pm 0,07^\circ\text{C}$, o oxigênio dissolvido $9,3 \pm 0,08$ mg/L e pH foi de $5,35 \pm 0,15$.

4.4 Parâmetros Sanguíneos e Metabólicos

Após os 15 dias do desafio bacteriano, quatro peixes de cada aquário (16 espécimes) foram coletados e submetidos à indução anestésica com benzocaína e feita a retirada de sangue via punção caudal com seringas heparinizadas para análises de parâmetros sanguíneos e metabólicos.

Para avaliação da série vermelha foram determinados: o número de eritrócitos circulantes (RBC) com auxílio de câmara de Neubauer; o hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito; a concentração de hemoglobina ([Hb]) pelo método da cianometahemoglobina (KAMPEN e ZIJLSTRA, 1964). Foram determinadas constantes corpusculares: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) segundo BROW (1976).

Ainda, avaliando a série branca, extensões sanguíneas foram preparadas, fixadas com metanol, secas ao ar livre e coradas com corante Leishman, durante 15 minutos. Em seguida, foram realizadas, sobre microscopia de luz, a contagem diferencial de leucócitos, contando até 100 células por lâmina.

Os metabólitos plasmáticos tais como glicose, proteínas totais, colesterol e triglicerídeos foram determinados utilizando kits laboratoriais específicos da marca *In Humam*[®], seguindo as recomendações do fabricante.

4.5 Análises microbiológicas

Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por secção da medula espinhal, para extração de amostras do fígado, utilizado nas análises microbiológicas para verificação da presença do patógeno no órgão. A análise microbiológica foi feita pela técnica de espalhamento em superfície com alça de platina, em placas com meio Agar Nutriente.

As placas foram mantidas em incubadora a temperatura de 30°C e o crescimento de colônias bacterianas observado entre 24 e 72h. Colônias individuais foram selecionadas para os testes bioquímicos clássicos de identificação (BURROWS, 1973). Todos os isolados bacterianos foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos: Teste de Catalase, onde uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% foi depositada numa lâmina de microscópio e em seguida uma colônia colhida com uma alça foi esfregada nesta gota. Os isolados bacterianos que apresentaram como reação o aparecimento de bolhas, constatamos ser catalase positivo, e as que não apresentaram essa reação dizemos catalase negativo; Teste de Citocromo Oxidase, que consistiu em colocar uma gota do reagente Kovacs em um papel de filtro. Em seguida, uma colônia de casa isolado em estudo foi espalhada sobre a área do papel de filtro contendo o reagente, utilizando um bastão de vidro. Consideramos uma reação positiva quando na mistura do reagente com a massa bacteriana desenvolve-se a cor púrpura em até um minuto e reação negativa para as que não desenvolveram a cor; Teste SIM para H₂S, Indol e Motilidade,

que consistiu na punção de colônias dos isolados, no meio Ágar SIM, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, e incubação do material em estufa a 28°C por 24h para posterior leitura dos resultados; Teste MacConkey Agar, consistiu no estriamento de colônias de cada isolado sobre placa de Petri contendo meio semi-sólido MacConkey Agar, posteriormente incubadas em estufa a 28°C por 24h e em seguida leu-se os resultados, onde colônias rosada foram consideradas lactose-positivas e as transparentes consideradas lactose-negativas; Teste de glicose, que consistiu do uso de um meio básico, suplementado de uma solução estéril a 1% de glicose e da adição de tubos de Durhan (pequenos tubos de vidro) invertidos. Consideramos positivas as amostras que apresentaram turbidez e alteração na coloração. E a presença de bolhas de gás no interior do tubo de Durhan foi considerada prova positiva para produção de gás; Teste OF para oxidação e fermentação, onde uma colônia do isolado foi depositada por punção em meio líquido OF Basal Medium, que foi preparado em duplicata, onde uma dessas recebeu a adição de parafina, foi considerada degradação fermentativa, para os isolados que apresentaram uma coloração azulada em ambos os tubos, abertos e selados (parafina). Enquanto que as que apresentaram coloração azul só nos tubos abertos, foram consideradas decompostas por oxidação; Teste Simmons Citrate, a prova foi feita em meio semi-sólido inclinado de Simmons. Após incubação de 24h, os que apresentaram uma coloração azul no meio de cultura foram considerados provas positivas, e as que continuaram verdes consideradas provas negativas; Teste Urease, que consistiu em transferir uma porção do crescimento bacteriano com uma alça para o meio. Após o crescimento a prova foi revelada positiva quando tomou a coloração rosa choque; Teste GRAM, onde as células foram fixadas em lamina pelo calor e coradas com um corante básico, o violeta cristal; depois foram tratadas com lugol que é posteriormente eliminado com uma lavagem com solução descolorante. As células são então tratadas com fucsina. As células gram negativas aparecem coradas de vermelho e as gram positivas de azul (violeta); Teste KOH, onde uma gota de hidróxido de potássio a 3% foi depositada numa lâmina de microscópio e em seguida uma colônia colhida com uma alça foi esfregada nesta gota. Os isolados bacterianos que apresentaram a formação de um fio viscoso foram consideradas provas positivas e as que não apresentaram, provas negativas.

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos estão expressos como média±erro padrão da média. As diferenças obtidas entre os tratamentos foram comparadas por teste T a 5% de probabilidade.

5. Resultados e Discussão

Durante quinze dias após o desafio bacteriano os animais permaneceram íntegros e mantiveram atividade metabólica estável, houve 100% de sobrevivência dos peixes tanto do grupo controle quanto do grupo do imunestimulante. Na biometria realizada os valores médios de peso e de comprimento foram $29,15 \pm 3,0$ g e $10,48 \pm 0,3$ cm para o grupo controle e de $24,48 \pm 3,0$ g e $9,77 \pm 0,4$ cm para o grupo tratado com o imunestimulante (Tabela 01).

Tabela 01 Valores médios de peso e comprimento de tambaqui, dos dois tratamentos experimentais, após o desafio bacteriano.

Parâmetros	Controle	Ergosan
Peso (g)	$29,15 \pm 3,0$	$24,48 \pm 3,0$
Comprimento (cm)	$10,48 \pm 0,3$	$9,77 \pm 0,4$

5.1. Análises sanguíneas e metabólicas

O conhecimento de parâmetros hematológicos pode ser benéfico na avaliação das condições de saúde dos peixes (BAXHALL & DAISLEY, 1973; REHULKA, 1996). Os valores de contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) foram semelhantes entre os tratamentos (Tabela 02) e não foi constatada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as médias.

Tabela 02. Valores médios dos parâmetros hematológicos dos exemplares do grupo controle e do grupo Ergosan, após o desafio bacteriano.

Parâmetros	Controle	Ergosan
Ht (%)	$21,8 \pm 1,5$	$24,8 \pm 0,9$
RBC (10^6mm^{-3})	$2,6 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,2$
[Hb] (g/dL)	$6,0 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,4$
VCM (μm^3)	$96,1 \pm 14,0$	$101,3 \pm 7,6$
HCM (pg)	$27,0 \pm 4,3$	$23,3 \pm 2,1$
CHCM (%)	$26,9 \pm 1,8$	$24,6 \pm 2,0$

Os valores da contagem total de leucócitos estão descritos na tabela 03. A contagem diferencial revelou maior frequência de trombócitos, seguida por linfócitos, neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos. No entanto, não foram verificadas diferenças entre os grupos testados.

O número de leucócitos em teleósteos pode variar consideravelmente de uma espécie para outra, e entre peixes de uma mesma espécie sob diferentes condições ambientais e experimentais (EZZAT et al., 1974; HARDIG&HOGLUND, 1983; ELLSAESSER&CLEM, 1986; WAAGHO et al., 1988; KORCOK et al., 1988).

Neste trabalho, os trombócitos foram as células mais frequentes. Estes resultados discordam dos achados por TAVARES-DIAS et al. (1999) em *C. macropomum* mantidos em monocultivo intensivo, onde os neutrófilos foram as células mais frequentes. Os neutrófilos são muito relevantes em teleósteos, uma vez que mostram grande sensibilidade às modificações do meio (MAHAJAN&DHEER, 1979), porém neste trabalho os neutrófilos não foram tão expressivos quanto às células de trombócitos.

Os linfócitos foram o segundo tipo celular mais frequente no sangue dos animais analisados nesse trabalho. Alguns trabalhos destacam a predominância de linfócitos, em relação aos demais leucócitos, no sangue circulante de espécies das famílias: Pimelodidae (KAVAMOTO et al. 1983a); Loricariidae (KAVAMOTO et al. 1985; SATAKE et al. 1989), assim como em Characidae (MARTINS et al. 1995). A contagem diferencial mostrou uma frequência baixa de monócitos, que concorda com os achados de KAVAMOTO et al. (1985), e TAVARES-DIAS et al. (1999).

Eosinófilos, basófilos e monócitos foram evidenciados em baixas frequências. Os resultados para monócitos concordam com os encontrados por KAVAMOTO et al. (1985). Já para os resultados de eosinófilos e basófilos, KAVAMOTO et al. (1985) também descreve uma baixa ocorrência de ambos os leucócitos. MOURA et al. (1994) verificaram a ocorrência de basófilos em *C. macropomum* quando aclimatados a 20, 25 e 30°C, mas não a 35 e 40°C. Todavia eosinófilos foram observados em todas as temperaturas.

A célula granulocítica especial (CGE), não foi encontrada no sangue dos animais analisados neste trabalho. TAVARES-DIAS et al. (1999), também observou uma baixa frequência dessa célula em seu trabalho. Essa célula não foram verificada no sangue de algumas espécies do grupo Loricariidae (KAVAMOTO et al. 1985) e Characidae (MARTINS et al. 1995).

Tabela 03. Contagem diferencial de leucócitos do sangue dos exemplares do grupo controle e do grupo Ergosan, após o desafio bacteriano.

Parâmetros	Controle	Ergosan
Monócitos (%)	1,25±0,83	0
Trombócitos (%)	43,5±7,2	57,1±5,09
Linfócitos (%)	47,25±5,8	40,25±5,1
Neutrófilos (%)	5,62±2,2	2,6±1,1
Basófilos (%)	1,75±1,75	0
Eosinófilos (%)	0,62±0,62	0

A dosagem da glicose sanguínea é considerada um método valioso no diagnóstico da ocorrência de estresse fisiológico em peixes (WENDERLAAR BONGA, 1997; ACERETE et al., 2004). Nesse estudo, o tambaqui não apresentou elevação dos teores de glicose que caracterizasse a ativação de respostas de adaptação geral. Os indicadores fisiológicos avaliados mostram que o tambaqui desafiado ainda consegue manter a sua homeostasia. Porém, também não foi constatada diferença significativa ($P>0,05$) entre as médias, assim também na de colesterol, triglicerídeos, e proteínas.

Tabela 04. Valores médios de colesterol, triglicerídeos, glicose e proteínas, do plasma dos exemplares de tambaqui de grupo controle e do grupo Ergosan, após o desafio bacteriano.

Parâmetros	Controle	Ergosan
Colesterol (mg/dL)	47,56±7,82	60,31±6,12
Triglicerídeos (mg/dL)	118,10±19,75	90,64±14,81
Glicose (mg/dL)	71,58±7,78	64,62±4,89
Proteínas (g/dL)	1,95±0,23	2,31±0,19

5.2. Análises microbiológicas

Dos onze isolados obtidos pela retirada de material para análises microbiológicas, foi possível identificar sete isolados (Tabela 04) como *Escherichia coli*, *Aerobacter spp.*, *Citrobacter sp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio sp.* pela tabela de identificação de William Burrows (1973).

Todas estas espécies identificadas são em sua maioria, associadas com contaminações ambientais. Não foi identificada a presença, por re-isolamento, da bactéria *Edwardsiella tarda* usada no desafio bacteriano.

Durante os quinze dias de observação dos dois tratamentos do nosso experimento não houve morte de nenhum exemplar, assim como também não houve sinais compatíveis com a forma septicêmica da doença causada por *Edwardsiella tarda*.

Tabela 05. Resultados dos testes bioquímicos realizados para identificação de bactérias, isoladas de tambaqui do grupo controle e do grupo Ergosan, após o desafio bacteriano.

Testes	i*1	i2	i3	i4	i5	i6	i7	i8	i9	i10	i11
Forma	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S produção	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Indole	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
KOH 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
MacCONKEY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
OF	O/F	O/F	O/F	O/-	O/F	O/F	O/-	O/-	O/-	O/-	O/F
Oxidase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmons Citrate	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Acid from:											
Glucose	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+	G /+
Inositol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
Sacarose	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+

*j = isolados

6. Considerações

Os peixes tanto do grupo controle quanto do grupo Ergosan não desenvolveram os sintomas de infecções causadas pela bactéria *Edwardsiella tarda*.

Não foi possível avaliar a eficácia do AquaVac Ergosan® em relação a manifestação bacteriana.

Mesmo sem a possibilidade de constatar a eficácia ou não do imunoestimulante, foi possível desenvolver o trabalho de modo científico e obter o treinamento específico na área de microbiologia e imunonutrição.

A realização de outras pesquisas com bactérias patogênicas de peixes e imunoestimulantes é uma interessante linha de pesquisa para a avaliação do uso de imunoestimulantes no cultivo de espécies nativas.

7. Referências Bibliográfica

ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, v.237, p.167-178, 2004.

AMAR, E. C., KIRON, V., Satoh, S., WATANABE, T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, v. 32, p. 162-173, 2001.

ARAÚJO-LIMA, C. e GOULDING, M. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. 186p. 1998.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOI, M.G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P.G.; SARTI, M. & MARINO, G. Short-and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunology*, 18(4):311-21. 2005.

BERMUDEZ, D. Preliminary Experiences in the Control of Fish Diseases in Warm Water Aquaculture Operations in Venezuela. *Journal of Fish Diseases* 3:355–57. 1980.

BROW, B. A. Hematology principles and procedures. Philadelphia. Lea & Febiger. 2nd edition. 1976.

BRICKNELL, I. & DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish immunology*, 19(5):457-72. 2005.

BLAXHALL, P. C., DAISLEY, K.W. Routine hematological methods for use with fish blood. *Jour. Fish Biol.* 5: 771-781. 1973.

BERNOTH, E.M. Risk assessment of bacterial infection from consumption of freshwater fish. *Bundesgesundheitsblatt*, v.34, p.6-8, 1991.

BURROWS, W. Textbook of microbiology. 20ed. Philadelphia, WB Saunders Company, p472. 1973.

CAMARGO, Sabrina G. O., POUHEY, Juvêncio L. O. F. Aquicultura - um mercado em expansão. R. bras. Agrociência, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396. 2005.

CARNEVALI, O.; SMITH, P.; GIOACCHINI, G. The effects of AquaVac Ergosan on the innate immunosystem and on the stress tolerance of trout. In: AQUACULTURE EUROPE, Fortezza da Basso Convention Centre, Florence, Italy. Anais... Florence, European Aquaculture Society, 2006, p. 194. 2006.

CASTRO, R.; ZARRA, I. & LAMAS, J. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. Aquaculture, 229(1-4):67-78. 2004.

CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T. E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: Tavares-Dias, M. (Ed.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: p. 132-225. Embrapa Amapá, 2009.

COSTA, A.B. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, p. 387-403, 2004.

DOYLE, M.P. Foodborne bacterial pathogens. In: HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9.ed. Maryland: Williams & Wilkins 1994. 1989.

DÜGENCI, S.K.; ARDAB, N.; CANDANA, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology, Leiden, 88(1): 99-106. 2003.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. 1. ed. Maringá: EDUEM, v.500. p171. 2002.

ELLSAESSER, C.K. & L.W. CLEM. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. Jour. Fish Biol. 28: 511-521. 1986.

EZZAT, A.A.; SHABANA, M.B.; FARGHALY, A.M. Studies on blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais). I. Blood cells. Jour. Fish. Biol. 6 (1): 1-12. 1974.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165. 1999.

GIOACCHINI, G.; SMITH, P.; CARNEVALI, O. Effects of Ergosan on the expression of cytokine genes in the liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to enteric red mouth vaccine. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 123, p. 215-222, 2008.

HARDIG, I.; HOGLUND, L.B. On accuracy in estimating fish blood variables. Comp. Biochem. 75A: 35-40. 1983.

KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.; TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em "bagre" *Rhamdia hilarii* (Va1.1840) teleósteos, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. Bol. Inst. Pesca 10: 53-60. 1983a.

KAVAMOTO, E.T.; TOKUMARU, M.; SOUZA E SILVA, R.A.P.; CAMPOS, B.E.S. Variações morfológicas e contagem diferencial das células leucocitárias do "cascudo" *Plecostomus albopunetatus* (Regan, 1908), em relação ao desenvolvimento gonadaJ. Bol. Inst. Pesca 12 (2): 15-23. 1985.

KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Standartization of hemoglobinometry. In: Erythrocytometric methods and their standartization. Ch.G Boroviczény ad. Bibl. Haematol. v.18, p.68-72. 1964.

KINKELIN, P.; MICHEL, P. de; GHITTINO, P. Tratado de las Enfermedades de los Peces. Zaragoza, Acribia, 353 p. 1991.

KORCOCK,D.E.; A.H. HOUSTON &J.O. GRAY. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Jour. Fish. Biol. 33: 319-330. 1988.

MAHAJAN, C .L.; OHEER, I.S. Cell types in the peripheral blood of na air breathing fish *Channa punctatus*. Jour. Fish. Biol. 14: 481-487. 1979.

MARTINS, M.L.; N. CASTAGNOLLI; ZUIM, S.M.F.; URBINATI, E.C. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamieus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae). *Revta bras. Zool.* 12 (3): 609-618. 1995.

MOURA, M.A.F.; I.P. FARIAS & A.L. VAL. Effects of temperatura on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Brazilian Jour. Med. Biol. Res.* 27: 1589-1598. 1994.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasil, 2008-2009. 99p.

NETTLES, R.E., SEXTON, D.J. Successful treatment of *Edwardsiella tarda* prosthetic valve endocarditis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, v.25, p.918-919; 1997.

NOGA, E. J. Fish disease: diagnosis and treatment. Missouri: Mosby, p367, 1996.

PASTOR, E.Z. Principales enfermedades infecciosas de los peces. Barcelona: Aedos, p175. 1981.

PAVANELLI, G.C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnósticos e tratamentos. Maringá: Nupélia, p264. 1998.

PAVANELLI G. C.; EIRAS J. C.; TAKEMOTO R. M. Doenças de peixes. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Maringá: Eduem., Ed. 2ª., CNPq: Nupélia, 2002.

PEDDIE, S.; ZOU, J.; SECOMBES, C.J. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(1-2):101-13. 2002.

PORTZ, L. Recentes Avanços na ImunoNutrição de Peixes. In: SILVA-SOUZA, A.T. Sanidade de Organismos Aquáticos. Maringá: ABRAPOA. p.229-236. 2006.

QUEIROZ, J. P.; LOUREÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C.; SCORVO-FILHO, J. D.; CYRINO, J. E. P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W. C.; BERNADINO, G. Aquaculture in Brasil: Reserch priorities and potencial for further international collaboration. In: Word Aquacultore, Baton Rouge, v.36, p.45-50. 2005.

RAA, J.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASINGLE, R.P.; ARTHUR, J.R. Disease in Asian Aquaculture I. Manila: Asian Fisheries Society, p.39-50. 1992.

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, Mexico, 2000.

REHULKA, J. Blood parameters in common carp with spontaneous spring viremia (SVC). Aquacult. Int. 4 (2): 175-182. 1996.

SAKAI, M. Current research status of immunostimulants. Aquaculture, v. 172, p. 63-92, 1999.

SATAKE, T.; A. NUTRI SOBRINHO; O.V. PAULA-LOPES; R.A. LOPES & H.S. LEMESANTOS. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XI. As células brancas do cascudo *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Pisces, Loricariidae). Ars Veterinaria 5 (1): 107-111. 1989.

SCHERING-PLOUGH Animal Health Corp. Aquaculture Centre, 556 Morris Ave Summit NJ 07901 USA. Disponível em: <<http://www.spaquaculture.com>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

SUFRAMA. Potencialidades Regionais. Estudo De Viabilidade Econômica – Sumário Executivo. Isae/Fundação Getúlio Vargas (Fgv). 2003.

TAVARES-DIAS, M.; E.F.S. SANDRIM & CAMPOS-FILHO, E. Características Hematológicas do tambaqui (*Colossoma Macropomum*) Cuvier, 1818 (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. Revta Bras. Zool 16 (1): 175-184. 1999.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L.; Alternativas para a Prevenção e o Controle de patógenos em Piscicultura. B. Inst. Pesca, São Paulo, 35(2): 335 - 341, 2009.

VAINIKKA, A., JOKINEN, E.I., KORTET, R., PAUKKU, S.; PIRHONEN, J.; RANTALA, M.J.; TASKINEN, J. Effects of testosterone and β -glucan on immune functions in tench. Jour. of Fish Biology, v. 66, p. 348-361, 2005.

VAL, A. L.; ROLIM, P. R.; RABELO, H. Situação atual da aquicultura na Região Norte. In: VALENTE, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. (Ed.). Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília, DF: CNPq; MCT, p.247-266. 2000.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; SOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology, v. 8, p. 409-24, 1998.

WAAGBO, R.; SANDNES, K; ESPELID, S; LIE, O. Haematological and biochemical analyses of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. suffering from coldwater vibriosis (*Hitra disease*). Jour .Fish Diseases 11: 417-423. 1988.

WEDEMEYER, G.A. Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall. New York, 1996.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. Physiological Reviews. v.77, n.3, p.591-625. 1997.

WINSOR, D. K.; BLOEBAUM, A. P.; MATHEWSON, J. J. Gram- negative aerobic, enteric pathogens among intestinal microflora of wild turkey vultures (*Cathartes aura*) in west central Texas. Appl. Environm. Microbiol., 42: 1123- 1124. 1981.

WYATT, L. E.; NICKELSON, I. I. R.; VANDERZANT, C. *Edwardsiella tarda* in fresh water catfish on their enviroment. Appl Environ Micro, 38: 710714. 1979.