



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Samira Teixeira Leal de Oliveira

**Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo  
suplementadas com *Ascophyllum nodosum***

Petrolina – PE  
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Samira Teixeira Leal de Oliveira

**Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo  
suplementadas com *Ascophyllum nodosum***

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Co-orientadora: Dr. Gisele Veneroni Gouveia

Petrolina - PE  
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Samira Teixeira Leal de Oliveira

**Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo  
suplementadas com *Ascophyllum nodosum***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em  
**Ciências Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.**

---

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Prof. Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof.Dr. Jane Eyre Gabriel  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina, 14 de julho de 2011

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde e oportunidade de estudar em mais um mestrado.

Ao Professor Doutor Mateus Matuzzi da Costa, que contribuiu de forma intensa na minha formação, desde a graduação e agora no mestrado, obrigada pela **grande orientação, confiança, oportunidade e, ensinamentos.**

Aos meus pais pela confiança e toda admiração que sempre tiveram e que permanece por mim, agradeço. Mãe, sem você eu nada seria...

Aos meus amados **irmãos Tércio e Pablo**, por continuarem com seu apoio independente de meus erros e acertos, sempre ao meu lado, especialmente Tércio pela convivência e companheirismo. A minha sobrinha, linda, que me fez virar "titia" oficial.

A muitos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf, a Valdenice, Ceíça, Carina, Renan, Marcelo, Renata, Jone, Chirles, Grace, Renatinha, Isabela, Isabele, Jeniffer, Wellighton, Luciana, Manoel, Mariele, Milka, Layse, Jarbas, por ter aberto ou fechado a torneira, ou por apenas sua amizade.., em especial à Gisele, por ter-me acompanhado nos trabalhos com dedicação e principalmente paciência, por todos os ensinamentos e co-orientação.

O meu agradecimento especial, também, vai para os colegas Renilde, Adílio, Vitinho, Woshigton e principalmente Augusto, pelo suporte, momentos de alegria e distração.

Agradeço aos meus amigos, Sr. Francisco, Lurdes, Samara, Eliária, Emerson, todos, mas todos e eternos amigos, que de uma grande forma, contribuíram com sua amizade, destacando Val e a minha amiguinha Sília, sempre me incentivando e contribuições eternas.....

Agradeço a CODEVASF sempre parceiros, em especial ao engenheiro, amigo Rozzanno, pelo apoio ao desenvolvimento das pesquisas, assim como a Valeagro, em especial ao amigo José Ramos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Aos funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

A todos os professores e colegas do programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

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

## RESUMO

A piscicultura se apresenta como uma alternativa de fonte de renda importante para a região do Vale do São Francisco. Assim, o desenvolvimento de estudos nessa área é de grande importância. Diante desse fato, o objetivo geral do presente trabalho foi realizar a caracterização molecular em *Aeromonas hydrophila* obtidas no Sub-médio São Francisco. Além disto, determinar um modelo de inoculação deste patógeno e avaliar *in vivo* o potencial antimicrobiano da *Ascophyllum nodosum*. Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf, assim como os isolados utilizados foram provenientes da bacterioteca deste laboratório. Para execução dos experimentos *in vivo* foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e aquários com 60 L de volume útil, alimentados com rações peletizadas, fabricadas exclusivamente para os estudos em questão. As condições ambientais para os alevinos de tilápia foram mantidas nos limites adequados para a espécie, com boa qualidade de água e temperaturas. Na caracterização molecular dos genes aerolisina, hidrolipase, elastase e lipase em *A. hydrophila*, foram evidenciados 12 padrões distintos quanto à presença desses fatores. A associação observada com maior frequência foi a dos quatro genes concomitantes, descrita em 21 isolados. Do total de isolados (114), 100 (87,72%) apresentaram pelo menos um dos fatores de virulência pesquisados, sendo a aerolisina o mais frequente. Quanto a experimentação *in vivo*, não foi verificada relação estatística entre a presença de fatores de virulência e a mortalidade ocasionada por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo. Os isolados causaram lesões nos peixes, mesmo na ausência dos genes estudados. No efeito das aflatoxinas sobre virulência de *A. hydrophila* em tilápias do Nilo, a sobrevivência, o comprimento total (CT) e a conversão alimentar aparente (CAA) dos alevinos, foram influenciados ( $P < 0,05$ ) em função dos tratamentos. A sobrevivência foi maior no tratamento testemunha. O CT e CAA foram melhores no tratamento testemunha em comparação ao tratamento de maior dose de aflatoxina, assim, foi possível verificar que a ação sinérgica de aflatoxinas e *Aeromonas hydrophila*, mostrou-se eficaz em provocar a morte dos peixes experimentais. Testando a farinha da alga marinha *A. nodosum* (FAM) na alimentação de tilápia verificou-se que, esta apresentou numericamente valores superiores nos parâmetros de desempenho e carcaça, aos encontrados pelo tratamento testemunha e, o seu efeito após a inoculação de *A. hydrophila*, reduziu o número de lesões nos peixes em menor tempo quando comparado ao controle.

Palavras chave: genes de virulência, tilápia do Nilo, aflatoxinas, *Aeromonas hydrophila*, *Ascophyllum nodosum*

## ABSTRACT

Fish farming is presented as an alternative important source of income for the region of the São Francisco. Thus, the development of studies in this area is of great importance. Given this fact, the overall objective of this study was the molecular characterization of *Aeromonas hydrophila* obtained from the Sub-middle São Francisco. Moreover, determining a model of pathogen inoculation and to evaluate in vivo the antimicrobial potential of *Ascophyllum nodosum*. The experiments were performed in the laboratory of Microbiology and Immunology Animal Univasf, as well as the isolates used were from this laboratory bacterioteca. For the execution of in vivo experiments were used Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and aquariums with 60 L working volume fed pelleted rations, made exclusively for the studies in question. The environmental conditions for tilapia fingerlings were maintained within an appropriate range for the species, with good water quality and temperatures. In the molecular characterization of genes aerolisina, hidrolipase, elastase, and lipase in *A. hydrophila*, 12 distinct patterns were found for the presence of these factors. The association most frequently observed was the concomitant of the four genes, described in 21 isolated. Of the total isolates (114), 100 (87.72%) had at least one of the virulence factors studied, being the most frequent aerolisina. The in vivo experiments, there was no statistical relationship between the presence of virulence factors and mortality caused by *A. hydrophila* in Nile tilapia. The isolates caused lesions in fish, even in the absence of the genes studied. The effect of aflatoxins on virulence of *A. hydrophila* in Nile tilapia, survival, total length (TL) and feed conversion (CAA) of the fingerlings were influenced ( $P < 0.05$ ) according to the treatments. Survival was greater in the control treatment. The CAA and CT were better in the control treatment compared to treatment a higher dose of aflatoxin was thus possible to verify that the synergistic action of aflatoxins and *Aeromonas hydrophila*, was effective in causing the death of the experimental fish. Testing the seaweed flour *A. nodosum* (FAM) in diets for tilapia was found that this showed numerically higher values in the parameters of performance and carcass, found by the control treatment and the effect of *A. hydrophila* after inoculation reduced the number of lesions in fish in less time when compared to control.

Keywords: genes of virulence, tilapia of the Nile, aflatoxins, *Aeromonas hydrophila*, *Ascophyllum nodosum*

## LISTA DE QUADROS

### Capítulo 2

**Quadro 1:** Relação dos indicadores usados para pesquisa dos genes de virulência  
29

**Quadro 2:** Produtos utilizados para formar a reação da PCR para genes de virulência de *A. hydrophila*.....29

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

**Quadro 1:** Relação dos indicadores usados para pesquisa dos genes de virulência  
28

**Quadro 2:** Produtos utilizados para formar a reação da PCR para genes de virulência de *A. hydrophila*.....29

**Figura 1.** Mortalidade dos alevinos de tilápia do Nilo após inoculação: (1) tratamento inoculado com solução salina, (2) inoculados com isolados de *A. hydrophila* contendo nenhum gene de virulência, (3) com dois genes e (4) com quatro genes..33

**Figura 2.** Evolução no número de lesões causadas por *A. hydrophila* com diferentes quantidades de genes de virulência nos alevinos de tilápia do Nilo.....34

### Capítulo 3

**Figura 1:** Sobrevivência dos alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila*.....51

**Figura 2:** Conversão alimentar aparente dos alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila*.....53

**Figura 3:** Comprimento total dos alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila* .....55

### Capítulo 4

**Figura 1:** Evolução no número das lesões causadas por *A. hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo alimentados (T4) ou não (T3) com farinha de *A. nodusum*.....73

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Composição bromatológica da farinha da alga marinha marrom ( <i>Ascophyllum nodosum</i> ) informada pelo fabricante.....	23
---	----

### Capítulo 2

<b>Tabela 1:</b> Relação dos genes de virulência presentes nos isolados de <i>A. hydrophila</i>	31
<b>Tabela 2:</b> Combinações e ocorrência dos genes de virulência nos isolados de <i>A. hydrophila</i> .....	32
<b>Tabela 3.</b> Valores médios do peso inicial dos alevinos de tilápia do Nilo.....	33

### Capítulo 3

<b>Tabela 1:</b> Composição percentual das rações experimentais.....	47
<b>Tabela 2:</b> Valores médios dos parâmetros de desempenho e conversão alimentar aparente (CAa) dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes de aflatoxinas.....	50
<b>Tabela 3:</b> Peso e ganho de peso médio de tilápias do Nilo submetidos a rações contendo aflatoxina, inoculados com <i>A. hydrophila</i> (2, 3, 4 e 5) e solução salina.....	52
<b>Tabela 4:</b> Valores finais médios dos parâmetros corporais das tilápias do Nilo submetidos à desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de <i>A. hydrophila</i> .....	54
<b>Tabela 5:</b> Índice hepatossomático (IHS) e fator de condição (FC) de tilápia do Nilo submetidos à desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de <i>A. hydrophila</i> .....	56

### Capítulo 4

<b>Tabela 1:</b> Composição das rações experimentais.....	66
<b>Tabela 2:</b> Composição bromatológica da farinha da alga marinha marrom ( <i>Ascophyllum nodosum</i> ) informada pelo fabricante.....	67

**Tabela 3:** Valores médios de crescimento e características de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com 20 g.kg ração<sup>-1</sup> de FAM (2) e ração testemunha 70

**Tabela 4:** Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente (CAa) e sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo..... 71

**Tabela 5:** Valores finais médios dos parâmetros corporais das tilápias do Nilo submetidos a uma rações contendo farinha de alga marrom *Ascophyllum nodosum* pós inoculação de *A. hydrophila*..... 72

**Tabela 6:** Valores finais do rendimento de carcaça e índice hepatossomático dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a uma rações contendo farinha de alga marrom *Ascophyllum nodosum* pós inoculação de *A. hydrophila*.....72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	.....	Ácido desoxirribonucléico
H	.....	Hora
L	.....	Litro
MG	.....	Miligrama
mL	.....	Mililitro
mM	.....	Milimolar
N	.....	Normal
PB	.....	Pares de base
PCR	.....	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	.....	Ácido ribonucléico
FAM	.....	Farinha da alga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

N.º	.....	Número
%	.....	Porcentagem
µL	.....	Microlitro
°C	.....	Graus Celsius
g	.....	Gramas

# SUMÁRIO

RESUMO.....	6
LISTA DE QUADROS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	11
LISTA DE SÍMBOLOS .....	11
1 - Introdução Geral.....	14
2 - Referencial Teórico.....	15
2.1. Piscicultura – tilápia do Nilo .....	15
2.2. <i>Aeromonas</i> spp. – <i>Aeromonas hydrophila</i> e sua virulência em organismos aquáticos..	17
2.3. Micotoxinas – Aflatoxinas.....	20
2.4. <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	22
3 - Artigos Científicos.....	25
Artigo 1 .....	25
RESUMO.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS: .....	28
2.1. Local .....	28
2.2. Isolados bacterianos .....	28
2.3. Caracterização molecular dos isolados .....	28
2.4. Inoculação de <i>A. hydrophila</i> com diferentes frequências de fatores de virulência em alevinos de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	30
2.4.1. Condições experimentais.....	30
3. RESULTADOS .....	31
3.1 PCR.....	31
3.2. Inoculação de <i>A. hydrophila</i> com diferentes frequências de fatores de virulência em alevinos de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	32

4. DISCUSSÃO .....	34
5. CONCLUSÕES.....	37
AGRADECIMENTOS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
Artigo 2 .....	43
RESUMO.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
2.1. Local .....	46
2.2. Animais experimentais .....	46
2.3. Rações.....	46
2.4. Efeito das aflatoxinas sobre o desempenho de tilápias do Nilo....	47
2.5. Efeito da aflatoxina sobre virulência de <i>A. hydrophila</i> em tilápias do Nilo .....	48
3. RESULTADOS .....	49
3.1. Efeito das aflatoxinas sobre o desempenho de tilápias do Nilo .....	49
3.1.1. <i>Água dos aquários e cultivo bacteriano</i> .....	49
3.1.2. <i>Sobrevivência, crescimento e conversão alimentar</i> .....	49
3.2. Efeito da aflatoxina sobre virulência de <i>A. hydrophila</i> em tilápias do Nilo.....	50
3.2.1. <i>Água dos aquários e cultivo bacteriano</i> .....	50
3.2.2. <i>Sobrevivência, crescimento e conversão alimentar</i> .....	51
3.2.3. <i>Características e rendimento de carcaça</i> .....	53
3.2.4. <i>Índice hepatossomático e fator de condição</i> .....	55
4. DISCUSSÃO .....	56
5. CONCLUSÃO.....	58
AGRADECIMENTOS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
Artigo 3 .....	62
RESUMO.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	63

2. MATERIAL E MÉTODOS .....	65
2.1. Condições experimentais .....	65
2.2. Rações.....	66
2.3. <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	66
2.4. Inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	67
2.5. Medições e análises.....	68
3. RESULTADOS .....	69
3.1. Efeito da <i>Ascophyllum nodosum</i> ante inoculação Efeito da <i>Ascophyllum nodosum</i> antes da inoculação com <i>A. hydrophila</i> .....	69
3.1.1. <i>Água dos aquários e cultivo bacteriano</i> .....	69
3.1.2. <i>Crescimento e características de carcaça</i> .....	69
3.2. Efeito da <i>Ascophyllum nodosum</i> após inoculação com <i>A. hydrophila</i> .....	70
3.2.1. <i>Água dos aquários e cultivo bacteriano</i> .....	70
3.2.2. <i>Sobrevivência, crescimento e conversão alimentar</i> .....	71
3.2.3. <i>Características e rendimento de carcaça</i> .....	72
3.2.4. <i>Evolução das lesões causadas por Aeromonas hydrophila</i> .....	73
4. DISCUSSÃO .....	73
5. CONCLUSÃO .....	75
AGRADECIMENTOS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	80

## 1 - Introdução Geral

A piscicultura é um seguimento muito significativo e de rápida expansão da indústria. Hoje, representa importante aporte de proteína animal, fornecimento mundial de 142 milhões de toneladas de pescado somente em 2008, dos quais 81% se destinaram ao consumo e proporcionou um fornecimento per capita aparente de aproximadamente 17 kg (equivalente de peso vivo), fato que representa um recorde (FAO, 2010). Isoladamente, o Brasil vem aumentando a sua produção em 25% nos últimos oito anos (BRASIL, 2010).

O Semiárido Nordeste é uma das regiões brasileiras, que apresenta além de um vasto território, um cenário climático favorável à implantação de sistemas de cultivo de espécies tropicais, pois apresenta altas temperaturas durante a maior parte do ano, além de dispor de consideráveis reservatórios aquáticos, como o Rio São Francisco, suas barragens, açudes, canais de irrigação e lagoas. Reservatórios este que são propícios à implantação de sistemas de cultivo de peixes, salvo seu baixo índice pluviométrico. Essa atividade pode se tornar uma importante usina de emprego e renda para a população local, com efeito positivo às comunidades ribeirinhas.

O cultivo de espécies exóticas como a tilápia do Nilo vem se destacando e tem representado uma alternativa importante para a região, pois apresenta um pacote tecnológico de cultivo avançado, dominado por técnicos e produtores e, ótima adaptação ao cultivo em cativeiro. Além de seus favoráveis fatores de criação e desempenho, a tilápia apresenta excelente qualidade de carcaça já bem reconhecida e aceita pelo mercado consumidor.

A piscicultura é um setor produtivo de crescimento vigoroso e importante. No entanto, boas práticas de manejo e profilaxia ainda são limitadas nessa cultura. Desordens nutricionais e doenças causadas por agentes patológicos, principalmente de origem bacteriana, são causas de grandes perdas e prejuízos nessa atividade agropecuária. Sabem-se hoje, a importância dos contaminantes de rações, como as micotoxinas e, o poder das bactérias do gênero *Aeromonas* spp., em apresentar elevado potencial para causar enfermidades em peixes.

As bactérias do gênero *Aeromonas*, em função da sua ocorrência significativa em criatórios de peixes, têm sido foco de estudos de identificação de fatores

potenciais de virulência, relacionados às causas de enfermidades. No entanto, ainda não está claro o mecanismo de virulência dessas bactérias e, elas demonstram ampla variação com relação à virulência dentre diferentes isolados, não somente em peixes como também em animais de sangue quente e alimentos.

Garantir uma adequada nutrição é fundamental para o bom funcionamento dos mecanismos de defesa dos peixes contra os estresses causados em sistemas intensivos de criação e patógenos. Desordens nutricionais prejudicam o crescimento, a eficiência alimentar e o sucesso reprodutivo dos peixes. A nutrição otimizada é um dos novos conceitos, dirigida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Nesse contexto, os alimentos funcionais e especialmente os prebióticos são conceitos novos e estimulantes.

A alga marinha marrom (*Ascophyllum nodosum*) inclui em sua composição, aminoácidos, carboidratos e diversos elementos nutritivos que lhes caracteriza como um bom ingrediente para ser utilizado como aditivo em rações para peixes. A sua eficácia no sistema imune e fatores relacionados ao desempenho, já vem sendo comprovada em animais terrestres e estudos em peixes é uma nova tendência.

Nesse contexto, os trabalhos aqui realizados objetivaram identificar a virulência de isolados de *A. hydrophila*, a partir da biologia molecular, ensaios *in vivo* sobre inoculação em tilápias do Nilo, com o fornecimento de aflatoxinas e posteriormente o uso da alga marinha *A. nodosum* nas rações.

## **2 - Referencial Teórico**

### **2.1. Piscicultura – tilápia do Nilo**

A aquicultura formada por pequenos e médios produtores vem mostrando, nos últimos anos, mudança nos sistemas de criação. Até o final da década de 90, se baseava no sistema semi-intensivo em viveiros escavados e de barragens. A partir

do ano de 2000, surge com força, a tilapicultura em tanques-rede, principalmente em águas da União (grandes reservatórios de hidroelétricas). Isso trouxe alterações na cadeia de produção, uma vez que, são necessários insumos adequados ao sistema, como rações específicas, material genético compatível com a criação e formas de escoar a produção, uma vez que o novo sistema apresenta maior escala de produção.

Em nível mundial, a tilápia vem correspondendo ao segundo maior grupo de peixes de água doce cultivado (Watanabe et al., 2002; Borghetti et al., 2003). No Brasil, entre os anos de 2000 e 2001, a produção de tilápia seguiu a mesma tendência mundial (Borghetti et al., 2003). Contudo, com a crescente taxa da produção piscícola brasileira, especialmente nos últimos 13 anos, as tilápias tornaram-se o principal grupo de peixe cultivado no Brasil, representando 32,50 e 37,90 % do total produzidos em 2002 e 2003 (Crescêncio, 2005) e 37,96 % em 2005 (IBAMA, 2007), respectivamente.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais indicadas para a criação intensiva, sendo esta, de grande importância para a aquicultura mundial. Sua produção é bastante promissora, considerando que essa espécie apresenta requisitos típicos dos peixes preferidos pelo mercado consumidor, tais como carne branca de textura firme e sabor delicado, ausência de espinhas em “Y”, além da alta taxa de crescimento, adaptabilidade a diversas condições de criação (Jory et al., 2000).

O Brasil produziu em 2007, 95.691,0 toneladas de tilápia representando 45% da produção da aquicultura continental, produção esta que mostra que a tilapicultura no Brasil tem uma contribuição importante para o crescimento da aquicultura nacional. No Semiárido Nordeste, apesar da baixa disponibilidade de água da chuva, a piscicultura pode se tornar um ramo importante de atividade econômica e social, em função da presença de alguns rios e suas barragens. Neste contexto o cultivo de espécies exóticas, como a tilápia do Nilo, tem se apresentado como uma alternativa importante para a Região, pois apresenta um pacote tecnológico de cultivo dominado por técnicos e produtores (Meurer et al., 2009).

Os sistemas de criação intensiva e superintensiva (race-way) permitem a utilização de massas de água inaproveitáveis, garante produtividade elevada devido à qualidade de água disponível, é de fácil despesca e, além disso, disponibiliza de um melhor controle da população incluindo a sanidade dos lotes. A fácil visualização

permite mantê-los saudáveis, pois qualquer transtorno é prontamente verificado, permitindo o controle de doenças, ainda no princípio, e uma profilaxia fácil de ser realizada. No entanto, é fundamental um controle rígido sobre a água utilizada, pois sua má qualidade acarreta aumento do estresse no indivíduo, o que leva a aumento da concentração plasmática de cortisol, incremento do lactato no sangue, tornando-os mais sensíveis às enfermidades, devido ao seu equilíbrio fisiológico e conseqüente alteração de seu sistema imunológico, debilitando sua capacidade de reagir aos patógenos, principalmente de origem bacteriana. As bactérias podem intensificar seu potencial patogênico quando as condições físicas e químicas do ambiente estão alteradas (WALTERS e PLUMB, 1980) sendo capazes de invadir o ambiente nutricionalmente vantajoso dos tecidos dos peixes e iniciarem processos de doenças (FRERICHS, 1989).

Entre os principais fatores a serem observados na qualidade da água estão o oxigênio dissolvido, pois sua redução pode facilitar o ataque das mais variadas espécies de patógenos; a temperatura da água, por serem animais ectotérmicos e em caso de oscilações bruscas, afeta seu metabolismo, expondo os peixes a severidade de doenças; o pH, que tem ação direta na sua mobilidade e influência na quantidade de amônia dissolvida; a renovação da água, o principal fator devido à retirada de grandes concentrações de substâncias tóxicas e/ou parasitas; e a densidade populacional, que merece atenção especial, pois elevadas taxas de densidade influenciam negativamente o desenvolvimento dos peixes, provocando estresse fisiológico e facilitando a proliferação e a transmissão de doenças (AUSTIN e AUSTIN, 1987)

## **2.2. *Aeromonas* spp. – *Aeromonas hydrophila* e sua virulência em organismos aquáticos**

O gênero *Aeromonas* compreende um grupo de micro-organismos universalmente distribuídos, considerado quase sinônimo de água e ambientes aquáticos. Podem ser isoladas desde águas potáveis até de águas residuais e de esgoto em vários estágios de tratamento (JANDA & ABBOTT, 2010), podendo

também ser encontradas em ambientes marinhos com baixa concentração de sal (KÜHN et al., 1997; SEN e RODGERS, 2004; JANDA & ABBOTT, 2010). São Gram-negativas e apresentam-se em forma de bastonete. Podem provocar um espectro variado de doenças em muitos animais de sangue frio e quente (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005).

Estes micro-organismos também têm sido isolados de alimentos, tais como legumes, carnes, presunto, miudezas, aves, peixes, marisco (KINGOMBE et al., 2004; OTTAVIANI et al., 2011) e, de água mineral engarrafada e termal (BISCARDI et al., 2002). Alimentos e água contaminados são prováveis fontes de veículo para infecções em humanos (KHAJANCHI et al., 2010; OTTAVIANI et al., 2011) e animais (ROSSI JR, et al., 2000). Em piscicultura, são tipicamente oportunistas, considerado um dos principais agentes patogênicos, que causam perdas consideráveis no cultivo. Podem provocar enfermidades em qualquer espécie de peixe, estando presente naturalmente na microbiota intestinal, sendo isoladas frequentemente de pescados com bom aspecto de saúde (CYRINO et al., 2004).

*Aeromonas hydrophila* é mais frequente do que as outras espécies de *Aeromonas* no desenvolvimento de doenças nos peixes, sendo que esta também reúne os isolados de maior virulência (PAVANELLI et al., 2008). Seus sinais clínicos de infecção em peixes podem variar de lesões de pele superficiais ou profundas, a quadros típicos de septicemia. As lesões de pele podem se apresentar como áreas de hemorragia e necrose de extensão variada, que podem progredir para úlceras que acometem geralmente o tecido muscular. Nos quadros de infecção sistêmica, é observada a exoftalmia, abdômen distendido, contendo líquido de aspecto opaco e/ou ligeiramente sanguinolento e presença de petéquias nas vísceras e parede interna da cavidade abdominal, hiperplasia do fígado, baço e rins (KUBTIZA e KUBTIZA, 2004). Recentemente tem sido a espécie de maior frequência em estudos com organismos aquáticos do Submédio São Francisco (SILVA, 2011 e SANTOS, 2011)

A patogênese bacteriana pode estar associada aos diversos fatores de virulência. Tais fatores permitem a bactéria colonizar, invadir, evitar o sistema de defesa e causar dano tecidual ao hospedeiro (VIZZOTTO, 2009). Esse potencial patogênico vem sendo foco de muitos estudos em microbiologia. Diversos pesquisadores descreveram vários fatores de virulência em *Aeromonas hydrophila*, dentre eles o antígeno-O, a presença de cápsula (MERINO et al., 1996 e ZHANG et

al., 2002), e camada S (DOOLEY e TRUST, 1988), presença de exotoxinas como hemolisinas e enterotoxinas (CHAKRABORTY et al., 1984), presença de exoenzimas como lipases, amilases e proteases (PEMBERTON et al., 1997; LEUNG & STEVENSON, 1988) e presença do sistema de secreção tipo III (SSTT) (YU et al., 2004). Sen (2005), também trabalhando com fatores de virulência, caracterizou a elastase e lipase e, Nan e Joh (2007), os flagelos laterais como fatores de patogenicidade em *Aeromonas hydrophila*.

Os peixes apresentam como importante mecanismo de defesa, o muco, as escamas e a pele, caracterizados como defesa não específica. Além da proteção contra injúrias físicas, possuem essencial função na osmorregulação, impedindo a entrada excessiva de água e a perda de íons dos tecidos para a água. O muco apresenta substâncias com ação neutralizante, bactericida e fungicida, bem como anticorpos e enzimas, fazendo deste uma das mais importantes barreiras contra organismos patogênicos (KUBITZA, F. & KUBITZA, L. et al., 2004).

Proteases causam danos aos tecidos e favorecem o estabelecimento da infecção por sobrepujar as defesas do hospedeiro. Também podem produzir um glicerofosfolípídeo que atua como uma lipase ou fosfolipase que pode causar lise de eritrócitos por digestão de sua membrana plasmática. As  $\alpha$ -hemolisinas produzem efeito citotóxico e lise incompleta, enquanto as  $\beta$ -hemolisinas produzem poros nas membranas celulares, destruindo a célula por ruptura (PEMBERTON et al., 1997). As *A. hydrophila* podem possuir ainda, um repertório de enzimas extracelulares tais como proteases, amilases e lipases, que digerem os componentes celulares (LEUNG & STEVENSON, 1988; PEMBERTON et al., 1997).

A aerolisina é um fator importante na patogenicidade de *A. hydrophila*. Ela é secretada como um precursor inativo (ABRAMI et al., 1998), mas é rapidamente convertida para toxina ativa. A proaerolisina é ativada pela remoção proteolítica de um peptídeo C-terminal (HOWARD & BUCKLEY, 1985) e é convertida por proteases, da bactéria e do hospedeiro, em aerolisina. A aerolisina se liga às proteínas de células eucarióticas, levando a formação de poros levando a ruptura das células, destruição da permeabilidade da membrana e lise osmótica (HOWARD & BUCKLEY, 1982). Essa proteína atravessa o interior e exterior das membranas das bactérias, bem como a membrana plasmática das células eucarióticas, ocasionando perfurações (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005). A aerolisina é um dos principais fatores de virulência e o mais encontrado e estudado.

A patogenicidade de algumas *Aeromonas* tem sido relacionada com a formação de Biofilme e, a produção deste já foi relacionada com presença de flagelos laterais e polares. Cepas de *Aeromonas* mesofílicas expressam um único flagelo polar em todas as condições de cultura e produzem flagelos laterais em meios de cultura sólidos. Essas células hiperflageladas têm demonstrado alta capacidade de aderência, fato que contribui para a formação de biofilmes (GAVÍN et al., 2002). Estudando a *Aeromonas hydrophila*, Canals et al., (2006) descobriram a relação da presença de flagelo lateral com a formação de biofilme. Pelo menos nove genes relacionados à produção de flagelo lateral (*laf* A a U) já foram identificados e caracterizados em *A. hydrophila* (GAVÍN et al., 2002).

A patogênese da *A. hydrophila* é multi fatorial e podem trabalhar em conjunto (YU et al., 2005). A importância dessa espécie como patógenos de peixes ainda não foi claramente definida e elas demonstram ampla variação com relação à virulência dentre os diferentes isolados. Contudo, dentro do complexo *Aeromonas* móveis, as mais virulentas pertencem à espécie *A. hydrophila* (COSTA, 2003). A variedade de enzimas produzidas por essas bactérias contribui significativamente para sua ampla distribuição e grande capacidade de adaptação às mudanças ambientais e patogenia (PEMBERTON et al., 1997).

### **2.3. Micotoxinas – Aflatoxinas**

Micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, produzidas por fungos filamentosos, aparentemente sem qualquer função no seu metabolismo normal. São produzidas, ainda que não exclusivamente, à medida que o fungo atinja a maturidade. Estes metabólitos constituem um conjunto químico toxigênico heterogêneos, que possui a capacidade de causar doenças no ser humano e animais, podendo levá-los a morte (BENNETT e KLICH, 2003).

Na década de sessenta, a mortalidade de milhares de perus na Inglaterra, mobilizou cientistas a buscarem a causa, e chegaram à possibilidade da existência de contaminação com toxinas de *Aspergillus flavus*, presentes na ração contendo torta de amendoim (BENNETT e KLICH, 2003). Na mesma década, um surto tóxico

causou prejuízos em piscicultura de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), pelo consumo de ração contendo farinhas de oleaginosas (ROBERTS, 1981). Estando associadas principalmente a grãos de cereais, utilizados como ingredientes para a fabricação de rações (CYRINO et al., 2004). Diante disso, as micotoxinas começaram a ser foco de estudo.

Tais contaminantes podem ser formados em função de más condições de armazenamento de alimentos utilizados comumente na fabricação de rações (NRC, 1993). Além disso, as condições inadequadas de plantio, colheita, secagem e transporte de produtos agrícolas favorecem o crescimento fúngico. O *Aspergillus flavus*, é o fungo responsável pela produção de aflatoxinas, cuja presença na ração, mesmo que em pequenas quantidades (0,01 ppb), é suficiente para o desenvolvimento de doenças em peixes (CYRINO et al., 2004). Conforme relatado por Rosmaninho et al. (2001), as enfermidades causadas pelas micotoxinas são denominadas micotoxicoses, as quais são caracterizadas por síndromes difusas, com predomínio de lesões em determinados órgãos.

A aflatoxina é uma micotoxina altamente carcinogênica, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Aflatoxina B<sub>1</sub> é a mais tóxica, geralmente a principal produzida por cepas toxigênicas, e também a mais estudada (BENNETT e KLICH, 2003). Entretanto, deve-se destacar a possível ocorrência destas toxinas, sobretudo em rações destinadas aos peixes, devido ao fato de seus principais constituintes (milho, trigo, sorgo) serem produtos alimentícios particularmente susceptíveis ao desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus*. Peixes expostos a aflatoxina poderão apresentar baixo crescimento, lesões no fígado, estômago, intestino, baço, coração e rins. Seu sistema imunológico também é severamente prejudicado, levando conseqüentemente, a uma maior predisposição a doenças e grande mortalidade (KUBITZA, F. & KUBITZA, L. et al., 2004).

A concentração letal de aflatoxina em rações varia entre espécies, para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) 0,5 a 1 mg kg<sup>-1</sup> ração foi relatada como letal (KUBITZA, F. & KUBITZA, L. et al., 2004). Enquanto em alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) concentrações superiores a 350 ppb kg<sup>-1</sup> ração acarretaram deposição residual no fígado e carcaça (LOPES et al., 2005). De acordo com Lopes et al. (2005), de modo geral, as micotoxinas apresentam, grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem. Sendo que, podem

contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento (LOPES, et al., 2005).

O Brasil, devido ao seu clima tropical típico, propicia condições ideais para a proliferação de fungos toxigênicos (ROSMANINHO, et al., 2001). Levando em consideração os malefícios que as aflatoxinas podem proporcionar, foi estabelecido, em 1988, o nível máximo de tolerância de 50 µg/kg, dada pela somatória de B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>, sendo válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal (BRASIL, 1988).

#### **2.4. *Ascophyllum nodosum***

A *Ascophyllum nodosum*, é uma alga marinha marrom, que é comumente encontrada nas águas costeiras do Norte do Oceano Atlântico (BRANDEN et al., 2007). Pertencentes à divisão *Phaeophyta*, classe *Phaeophyceae* (RORRER & CHENEY, 2004), esta alga vem sendo explorada e utilizada comercialmente para a fabricação de produtos utilizados tanto na agricultura como na pecuária (FLEURENCE, 1999).

As macroalgas marinhas usualmente possuem grandes quantidades de carboidratos e proteínas (BENEVIDES et al., 1998). Um estudo realizado por Bird & Haas (1931) demonstrou a presença de grupos sulfatos nos monômeros de frutose em sua composição. Segundo Berteau & Mulloy (2003), algas marinhas marrons possuem uma quantidade considerável de fucanos sulfatados, oligossacarídeos que atuam sobre o sistema imune. Larsen et al. (1970), estudando a alga *A. nodosum*, obtiveram resultados que indicavam a presença de polissacarídeos com diferentes graus de sulfatação.

No grupo dos polissacarídeos sulfatados, as fucanas apresentam um grande potencial farmacológico devido a sua grande variabilidade estrutural (ALBUQUERQUE, 2005). O termo fucanas foi atribuído a um grupo de polissacarídeos exóticos que podem ser encontrados nas algas marinhas marrons e em aquinodermos.

Saker et al. (2004) afirmaram que o extrato de *A. nodosum* tem efeito positivo no sistema imune de ruminantes. A biodisponibilidade de microminerais, vitaminas, antioxidantes, bem como outros metabólitos presentes no *A. nodosum* podem ser fatores que afetam positivamente o desempenho do animal (FIKE et al., 2005).

A composição bromatológica da farinha de *A. nodosum*, comercializada é de 87% de matéria seca (MS), 6% de proteína bruta (PB), 6% de fibra bruta, 22% de matéria mineral (MM), 3% de extrato etéreo (EE) e 50% de carboidratos, entretanto, sua composição pode variar em função de variações da composição da *A. nodosum* fresca (Sharp, 1986). Conforme especificações do fabricante o conteúdo de aminoácidos, vitaminas e minerais estão apresentados na Tabela 2. Os valores percentuais encontrados por Meurer et al. (2010) (com base na matéria natural) para umidade, MM, matéria orgânica, EE e PB foram respectivamente 9,64; 22,34; 77,66; 2,49; 7,70; o valor de energia bruta foi 2.826,99 (kcal.kg<sup>-1</sup>). Os valores avaliados para a FAM estão de acordo com os apresentados por Sharp (1986) e próximos aos fornecidos pelo fabricante.

**Tabela 1.** Composição bromatológica da farinha da alga marinha marrom (*Ascophyllum nodosum*) informada pelo fabricante<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> Acadian Seaplants Limited.

Alves Filho (2010), apresentou coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) para a farinha da alga marinha *Ascophyllum nodosum* de 58,13% para a MS, 43,48% para a PB e 23,92% para a energia bruta em tilápias do Nilo. Quanto a proteína digestível e energia digestível, o CDA foram respectivamente, 3,39% e 678,47 kcal kg.

O fornecimento da *A. nodosum* na alimentação animal pode proporcionar melhoria em uma série de fatores relacionados ao desempenho, imunidade e qualidade da carne, mas estes dados são demonstrados pela literatura principalmente para animais terrestres (KANNAN et al., 2007a; KANNAN et al., 2007b; BRANDEN et al., 2007; ARCHER, et al., 2008; GARDNER et al., 2008).

Embasado nos efeitos evidenciados para animais terrestres a utilização da *A. nodosum* na alimentação de peixes vem sendo estudada. Meurer et al. (2010) afirmaram que a FAM apresenta um bom potencial para ser utilizada como aditivo para alevinos de tilápia do Nilo, a sua inclusão em níveis de até 20 g.kg ração<sup>-1</sup> não provocou prejuízos ao crescimento, melhorando os valores de conversão alimentar e rendimento de carcaça. De acordo com Nakagawa et al. (1997) a farinha da alga marinha *A. nodosun* pode ser utilizada como aditivo alimentar em rações para peixes. O mesmo autor demonstrou que a inclusão de 5% deste aditivo em rações para juvenis de red sea bream (*Pargrus major*), proporcionou um maior peso vivo e percentagem de proteína corporal.

### 3 - Artigos Científicos

#### Artigo 1

#### **Caracterização molecular de fatores de virulência em *Aeromonas hydrophila* obtidas de peixes**

Samira Teixeira Leal de Oliveira, Mateus Matiuzzi da Costa

#### **RESUMO**

Múltiplos fatores podem estar envolvidos nos processos de virulência da *Aeromonas hydrophila*. O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença dos genes de virulência Aerolisina, Hidrolipase, Elastase e Lipase, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em isolados de *Aeromonas hydrophila*, obtidas de peixes do Vale do Submédio São Francisco e, avaliar a sua virulência *in vivo* em alevinos de tilápia do Nilo. Foram utilizados 114 isolados da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco. O DNA foi termo-extraído e as PCR realizadas com iniciadores específicos descritos na literatura. Para testes *in vivo*, foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo. A partir dos testes de PCR, foram selecionados isolados negativo para todos os genes, positivos para dois genes (Aerolisina e Elastase) e positivos para os quatro genes testados. Estes foram inoculados  $10^8$  UFC/ml, propostos como tratamentos e mais um testemunha (com inoculação de solução salina). No total, foram evidenciados 12 padrões distintos quanto à presença dos fatores de virulência nos isolados de *A. hydrophila*. A associação de fatores de virulência observada com maior frequência foi Lipase / Elastase / Aerolisina / Hidrolipase, descrita em 21 isolados. Dos 114 isolados analisados, 100 (87,72%) apresentaram pelo menos um dos fatores de virulência pesquisados. Os fatores de virulência foram amplamente distribuídos entre os isolados de *A. hydrophila*. A aerolisina foi o fator de virulência presente em maior frequência nos isolados analisados. A *A. hydrophila* causou a mortalidade dos alevinos de tilápia do Nilo, independente da ausência ou quantidade dos genes de virulência testados.

Palavras chave: Aerolisina, Lipase, Elastase, Hidrolipase, inoculação, peixes

#### **ABSTRACT**

Multiple factors can be involved in the processes of virulence of the *Aeromonas hydrophila*. The objective of the present work was to verify the presence of the Aerolisina, Hidrolipase, Elastase and Lipase virulence genes, by means of the reaction in chain of polimerase (PCR), in isolated of *Aeromonas hydrophila*, gotten of fishes of the Valley of the Submédio San Francisco and to evaluate its alive virulence in alevinos of Nile tilapia . 114 Isolated ones of the bacterioteca of the Laboratório de Microbiologia and animal Imunologia had been used. The DNA was term-extracted and the PCR carried through with described specific primers in literature. For alive test in, had been used alevinos of tilapia of the Nile. From the PCR tests, negative isolated for the all genes, positive for two genes (Aerolisina and Elastase) and positive for the four tested genes had been selected. These had been inoculated 10<sup>8</sup> UFC/ml, considered as treatments and plus one witness (with inoculation of saline solution). In the total, 12 distinct standards to the presence of the virulence factors in the isolated ones *A. hydrophila* had been evidenced. The association of virulence factors observed with bigger frequency was Lipase/Elastase/Aerolisina/Hidrolipase, described in 21 isolated ones. Of the 114 isolated ones analyzed, 100 (87.72%) presented at least one of the searched factors of virulence. The virulence factors widely had been distributed between the *A. hydrophila* isolated. The aerolisina was the virulence factor present in bigger frequency in the isolated analyzed. To *A. hydrophila* it caused the mortality of the alevinos of t. Nile, independent of the amount or absence of the tested virulence genes .

Keywords: Aerolisin, Lipase, Elastase, Hidrolipase, inoculation, fish

## 1. INTRODUÇÃO

As *Aeromonas* spp. são caracteristicamente bactérias Gram-negativas de água doce, pertencentes à família Aeromonadaceae, anaeróbicas facultativas, encontradas em diversos ambientes, incluindo solo e água (NAM e JOH, 2007), podendo ainda ser componente da microbiota dos peixes (PAVANELLI, 2008). Estas bactérias são importantes agentes infecciosos (JANDA & ABBOTT, 2010). Assim como em humanos, o envolvimento desse microrganismo em doenças de peixes é geralmente associado a outras condições, e sua patogenicidade parece estar relacionada com estresse dos hospedeiros (CYRINO et al., 2004). Embora, pesquisadores tenham relatado *Aeromonas* spp, como patógenos emergentes e primários, possuindo mecanismos altamente específicos para promoção de doenças (CHACON et al., 2004; VILCHES et al., 2004; SHA et al., 2005; YU et al., 2005).

Amostras com alta virulência podem infectar peixes saudáveis, porém, o estresse oriundo de criações intensivas também colabora e propicia o desencadeamento de surtos (SUOMALAINEN et al., 2005). A espécie *Aeromonas hydrophila* é a mais comum dentro do gênero *Aeromonas* (CIPRIANO, 2001; MIRANDA e ZEMELMAN 2002; SANTOS, 2011; SILVA, 2011). Ela vem sendo isolada e identificada a partir de espécies com e sem sintomatologia clínica. Esta bactéria é considerada a mais virulenta dentro desse complexo (CYRINO et al., 2004).

Os fatores de virulência da bactéria estão relacionados com a invasão, replicação e evasão do sistema imune dos hospedeiros, além de provocarem as lesões durante a patogênese da doença (VILCHES et al., 2004). Diversos pesquisadores descreveram vários fatores de virulência em *Aeromonas hydrophila*, dentre elas o antígeno-O, presença cápsulas (MERINO et al., 1996 e ZHANG et al., 2002), e camada S (DOOLEY e TRUST, 1988), exotoxinas como hemolisinas e enterotoxinas (CHAKRABORTY et al., 1984), exoenzimas como lipases, amilases e proteases (LEUNG & STEVENSON, 1988; PEMBERTON et al., 1997) e o sistema de secreção tipo III (SSTT) (Yu et al., 2004). A patogênese da *A. hydrophila* é multifatorial (Yu et al., 2004), mas os mecanismos das doenças ainda não foram claramente esclarecidos.

Ferramentas e técnicas de biologia molecular como a PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), têm sido utilizadas para a identificação de agentes etiológicos causadores de enfermidades, permitindo a identificação de possíveis genes que codificam fatores de virulência responsáveis pela patogenia do micro-organismo. Além da caracterização molecular, faz-se necessário, avaliações *in vivo* para qualificação da sua patogenicidade em função da presença dos genes de virulência (COSTA et al., 2010).

Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar, por meio da PCR, a presença dos genes de virulência Aerolisina, Hidrolipase, Elastase e Lipase em isolados de *Aeromonas hydrophila*, obtidos de peixes pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) do Vale do Submédio São Francisco e, avaliar sob parâmetro de sobrevivência, a sua virulência em alevinos de tilápia do Nilo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS:**

### **2.1. Local**

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

### **2.2. Isolados bacterianos**

Um total de 114 isolados de *Aeromonas hydrophila*, foi utilizado neste estudo, adquiridos da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF. Esses isolados foram obtidos a partir de rim, tegumento, intestino e lesões de pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*). Os animais foram provenientes da Barragem de Sobradinho/BA e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros (CIRPA) de Bebedouro/PE. Os isolados de *Aeromonas hydrophila* foram previamente identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994), e através da PCR para confirmação de gênero e espécie, segundo metodologia descrita por Ghatak et al. (2007). As culturas foram repicadas em meio ágar Triptona de Soja (TSA), e então utilizadas para caracterização molecular.

### **2.3. Caracterização molecular dos isolados**

Os DNAs das *Aeromonas hydrophila*, foram termo-extraídos em um volume final de 50 µl. A PCR foi utilizada para averiguação da presença dos genes Aerolisina, Hidrolipase, Elastase e Lipase com primers específicos apresentados no Quadro 1. As reações de PCR, específicas para cada gene, estão descritas no Quadro 2.

**Quadro 1.** Relação dos indicadores usados para pesquisa dos genes de virulência

Gene	Primer	Indicadores (5' – 3')	Produto	Referência
Hidrolipase	<i>Lip-F</i>	AACCTGGTTCCGCTCAAGCCGTTG	65 pb	(CASCON et al., 1996)
	<i>Lip-R</i>	TTGCTCGCCTCGGCCAGCAGCT		
Elastase	<i>ahyB-F</i>	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	540 pb	(SEN, 2005)
	<i>ahyB-R</i>	CGCTGGTGTGGCCAGCAGG		
Lipase	<i>pla/lip-F</i>	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG	383 –	(SEN, 2005)
	<i>pla/lip-R</i>	CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	389 pb	
Aerolisina	<i>aer-F</i>	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG	431 pb	(HOWARD et al., 1987)
	<i>aer-R</i>	CCAGTTCAGTCCCACCACT		

**Quadro 2.** Produtos utilizados para formar a reação da PCR para genes de virulência de *A. hydrophila*

Produtos da reação	Genes de virulência			
	Hidrolipase	Elastase	Lipase	Aerolisina
Tampão de enzima	1X (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM KCl)			
MgCl <sub>2</sub> (mM)	2	1,2	1,5	2
dNTPs (mM)	0,4	0,4	0,2	0,4
Primers (pmol)	15	15	7,5	15
Taq DNA polimerase <sup>1</sup> (U)	2,5	0,15	2,5	2,5
DNA molde (μL)	8	4	4	8
Água ultra pura <sup>1</sup> (μL)	10,0	14,6	15,75	10,0
Total (μL)	25	25	25	25

<sup>1</sup>Ludwig Biotech

As PCRs foram realizadas sob condições semelhantes: para Hidrolipase, o primeiro passo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C, anelamento a 60,5 °C por 30 segundos e um passo de extensão a 72 °C por 30 segundos. Após o término dos ciclos adicionou-se mais uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Nos demais genes, a diferença consistiu na temperatura de anelamento (Elastase 60,6 °C; Lipase 58,2 °C; e Aerolisina 55,5 °C). Os produtos das PCRs foram visualizados em transiluminador com gel de agarose a 2% adicionado de brometo de etídeo.

## 2.4. Inoculação de *A. hydrophila* com diferentes frequências de fatores de virulência em alevinos de *Oreochromis niloticus*

### 2.4.1 Condições experimentais

Para cumprir o objetivo proposto da parte *in vivo*, foram utilizados 63 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de  $4,26 \pm 0,02$ , provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros (CIRPA) de Bebedouro. Os peixes foram distribuídos em 24 aquários, contendo 60 L de volume útil, em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. Sendo cada unidade experimental constituída por um aquário com três alevinos. Foram considerados como tratamentos, a inoculação dos isolados de *Aeromonas hydrophila* nos alevinos, sendo dois isolados distintos, negativos para todos os genes; dois positivos para dois genes; dois positivos para os cinco genes; e o tratamento controle, no qual não foi inoculada *A. hydrophila*, apenas solução salina.

Os aquários possuíam aeração constante por contato, por meio de pedras microporosas ligadas através de mangueiras de silicone a mini-compressores de ar. Diariamente, pela manhã (7h00) e à tarde (16h30min), eram sifonados, com a remoção de 40% da água, fezes e eventuais restos de ração. Ainda diariamente eram medidos os parâmetros físico-químicos da água, quanto à temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica.

Foi formulada uma ração de acordo com as exigências nutricionais da espécie nesta fase, composta de farelo de soja 70,79%; milho 16,70%; óleo de soja 5,00%; fosfato bicálcico 2,80%; calcário calcítico 0,20%; suplemento mineral e vitamínico 4,00%; sal 0,50%; e butil hidroxi tolueno (BHT) 0,01%. Esta foi fornecida a vontade, três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 17h00.

Após sete dias de adaptação, foi realizada a inoculação das *A. hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo por injeção intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe, de um preparado de inóculo bacteriano com diluição em solução salina estéril a concentração de  $10^8$  UFC/ml. Foi aplicada na proporção de 0,2 ml/peixe, a mesma quantidade para o tratamento testemunha, constando apenas de solução salina. O inóculo bacteriano possuindo dois genes de virulência, foi escolhido em função da maior ocorrência nas análises de PCR, constando da combinação de Lipase /

Aerolisina, a partir de então, as colônias a serem usadas foram escolhidas de forma aleatória dentro do grupo.

Após a inoculação, os peixes foram observados, quanto a eventuais alterações comportamentais, formação de lesões ulcerativas e mortalidade. O parâmetro de mortalidade, foi submetido à análise de variância (One-way ANOVA) e verificando efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) o teste Duncan foi realizado pelo software *Statistica 7.0*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PCR

A frequência dos fatores de virulência averiguados nos 114 isolados de *Aeromonas hydrophila* encontra-se na Tabela 1. O gene encontrado com maior frequência nos isolados foi a Aerolisina, enquanto que o menos frequente foi o da Hidrolipase.

**Tabela 1.** Relação dos genes de virulência presentes nos isolados de *A. hydrophilla*

Genes	Número de isolados	Ocorrência (%)
Aerolisina	90	78,95
Lipase	66	57,89
Elastase	53	46,49
Hidrolipase	41	35,96

Dos 114 isolados analisados, 100 (87,72%) apresentaram pelo menos um dos genes dos fatores de virulência pesquisados. Apenas um dos genes avaliados foi encontrado em 22% (22/100) dos isolados. A distribuição dos fatores de virulência nos isolados de *A. hydrophila* pode ser observada na Tabela 2. No total, foram evidenciados 12 padrões distintos quanto à presença dos genes para os fatores de

virulência nos isolados de *A. hydrophila*. A associação de fatores de virulência observada com maior frequência foi Lipase / Elastase / Aerolisina / Hidrolipase descrita em 20 isolados. A combinação Lipase / Elastase / Aerolisina foi relatada em 17 isolados e a presença do gene da aerolisina isoladamente na mesma quantidade. Um aspecto importante a destacar é que 42,98% dos isolados (49/114) apresentaram pelo menos três dos fatores de virulência pesquisados.

**Tabela 2.** Combinações e ocorrência dos genes de virulência nos isolados de *A. Hydrophila*

<b>Combinações dos genes</b>	<b>Número de isolados positivos</b>	<b>Ocorrência (%)</b>
Aerolisina	17	14,91
Lipase	4	3,51
Elastase	1	0,88
Lipase / Aerolisina	17	14,91
Aerolisina / Hidrolipase	5	4,39
Elastase / Aerolisina	4	3,51
Lipase/Elastase	3	2,63
Lipase / Elastase / Aerolisina	14	12,28
Elastase / Aerolisina / Hidrolipase	8	7,02
Lipase / Aerolisina / Hidrolipase	4	3,51
Lipase / Elastase / Hidrolipase	2	1,75
Lipase / Elastase / Aerolisina / Hidrolipase	21	18,42

### **3.2. Inoculação de *A. hydrophila* com diferentes frequências de fatores de virulência em alevinos de *Oreochromis niloticus***

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, foram, respectivamente,  $27,11 \pm 0,08$  °C;  $7,18 \pm 0,05$ ;  $7,40 \pm$

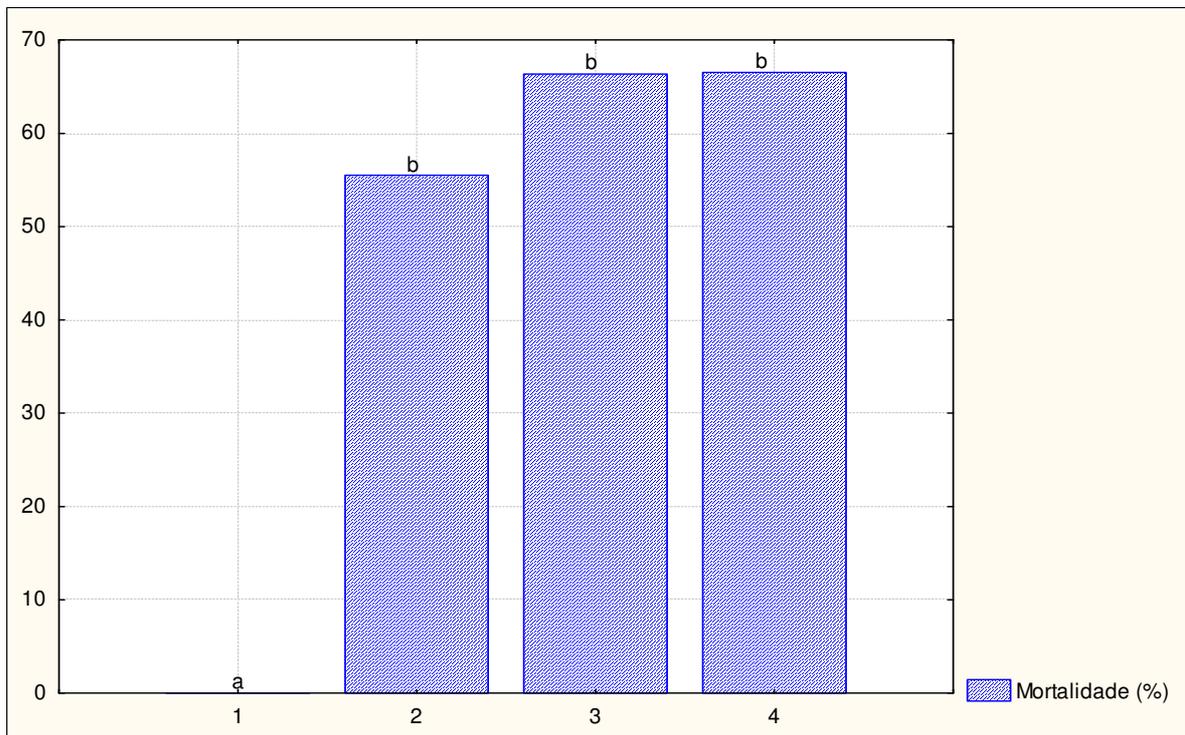
0,05 mg/L;  $76,73 \pm 0,58 \mu\text{Sm/cm}$ . Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

O peso inicial dos alevinos utilizados no experimento foi estatisticamente semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores médios do peso inicial dos alevinos de tilápia do Nilo

Tratamentos <sup>1</sup>	Peso inicial (g)
1	$4,2583 \pm 0,028005$
2	$4,2567 \pm 0,021688$
3	$4,2611 \pm 0,023539$
4	$4,2611 \pm 0,027053$
P*	0,0228

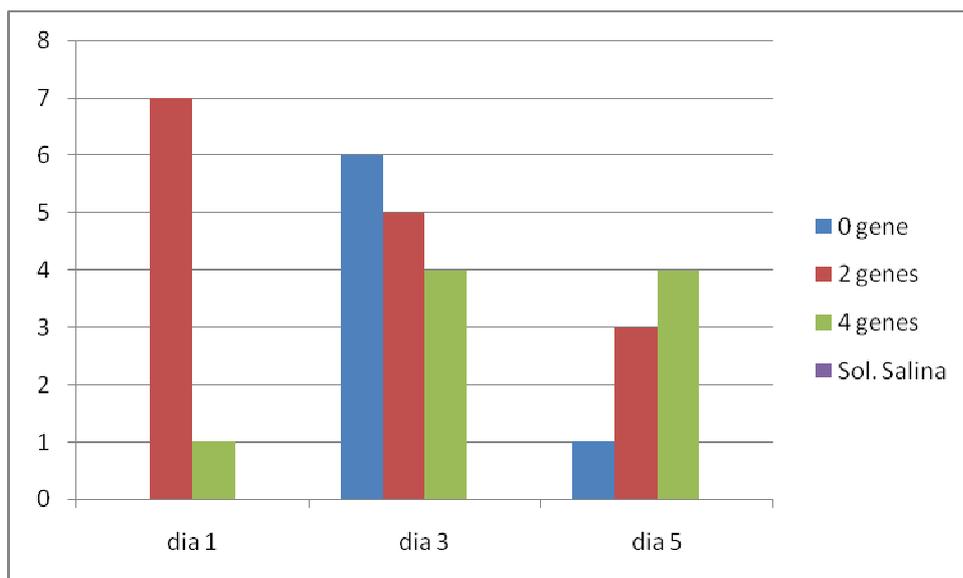
<sup>1</sup> (1) tratamento inoculado com solução salina, (2) inoculados com isolados de *A. hydrophila* negativo para os genes de virulência estudados, (3) positivo para dois genes e (4) positivo para os quatro genes.; \*P = P-valor



**Figura 1.** Mortalidade dos alevinos de tilápia do Nilo após inoculação: (1) tratamento inoculado com solução salina, (2) inoculados com isolados de *A. hydrophila* contendo nenhum gene de virulência, (3) com dois genes e (4) com quatro genes.

Os valores de mortalidade dos alevinos de tilápia do Nilo, inoculados com *Aeromonas hydrophila* contendo nenhum gene (n=2), positivo para dois genes (n=3), quatro genes (n=4) e com inoculação de apenas solução salina (n=1), estão descritos na Figura 1. Foi possível verificar que o tratamento testemunha (inoculados com solução salina), difere estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do tratamento 2, 3 e 4.

Na Figura 2, a evolução no número de lesões após a inoculação de *A. hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo, foi possível verificar que, no tratamento testemunha (inoculados com solução salina) não houve presença de lesões durante todo o período experimental, assim como em um período de 24 h, o tratamento no qual o isolado inoculado não continha os genes de virulência testados. Todavia, o comportamento das lesões modificou-se no terceiro dia, sendo maior em número de peixes para os isolados com menor número de genes de virulência, mas, esse comportamento foi invertido no quinto dia experimental.



**Figura 2.** Evolução no número de lesões causadas por *A. hydrophila* com diferentes quantidades de genes de virulência nos alevinos de tilápia do Nilo

#### 4. DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários, pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura permaneceram dentro dos limites adequados para a tilápia do Nilo (KUBITZA, 2003).

Neste trabalho, foram identificados genes de virulência em isolados de *A. hydrophila* obtidos de peixes do Vale do São Francisco, mediante a técnica de PCR. Devido à sua velocidade e sensibilidade, ensaios com PCR têm sido utilizados para detectar a distribuição de genes de virulência nos isolados de *Aeromonas* spp. (YU et al., 2005). Apenas 12,28% (14/114) não apresentaram nenhum fator de virulência, o que corrobora com os dados da literatura (LI et al., 2011). Este fato confirma o grande potencial de patogenicidade de *A. hydrophila* oriunda de peixes. O que permite supor sua elevada capacidade de causar enfermidades em peixes, especialmente por que estes foram isolados em sua maioria de animais enfermos.

Em nosso estudo não foi verificada relação estatística entre a presença de fatores de virulência e a mortalidade ocasionada por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo. Esta diferença foi observada apenas em relação ao grupo controle inoculado apenas com solução salina. Estes achados comprovam a patogenicidade dos isolados independentemente da presença dos fatores pesquisados (aerolisina, hidrolipase, lipase e elastase). A presença de fatores de virulência, em especial os relacionados a produtos extracelulares, desempenham um papel importante na translocação da *Aeromonas* spp. pelos epitélios, estando desta forma grandemente associados a virulência bacteriana (JUTFELT et al., 2008). Embora Ottaviani et al. (2011), estudando *Aeromona* spp. isoladas de fontes clínicas (humanos com diarreia), não encontraram essa relação nas estirpes, apesar de identificadas como a causa de gastroenterites aguda, sendo elas negativas para os fatores testados. Contudo a virulência de *Aeromonas* spp. pode ser associada a diversos fatores e, isolados de pacientes humanos geralmente não possuem uma relação genética significativa com os patógenos de organismos aquáticos. Este fato pode estar associado aos resultados descritos no presente estudo, especialmente se considerarmos que outros fatores de virulência além dos estudados no presente estudo foram descritos como marcadores de virulência em *A. hydrophila* (LI et al., 2011).

Alguns estudos relataram uma correlação positiva entre o maior número de genes de virulência abrigados em um isolado de *Aeromonas* spp. e seu potencial para determinar enfermidades (ALBERT et al, 2000; SHA et al. 2002; CHANG et al,

2008). Heuzenroeder et al. (1999), propuseram para a *A. hydrophila*, que a presença de dois genes poderia indicar sua virulência em animais. Estes achados confirmam que esta espécie possui uma matriz mais ampla de genes de virulência que as outras espécies de relevância clínica (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007). As cepas de *A. hydrophila* aqui investigadas, em sua maioria, tinham dois ou mais genes 68,42% (78/114), embora em diferentes combinações, o que destaca o seu potencial para patogenicidade, corroborando com o trabalho de Li et al. (2011), no qual afirmam que as propriedades de virulência da *A. hydrophila* possui boa correlação com o presença de genes de virulência específicos, sendo estes a aerolisina, enterotoxina e protease.

A aerolisina foi o fator descrito com maior frequência nos isolados de *A. hydrophila*, o que está de acordo com vários trabalhos (NAWAZ et al., 2010; NAM e JOH, 2007; LI et al., 2011). De acordo com Heuzenroeder et al. (1999) a presença da aerolisina é um forte indicio da virulência em isolados de *Aeromonas* spp. patogênicas. Biscardi et al. (2002), estudando a ocorrência de *A. hydrophila* em 84 amostras de água, isolaram seis linhagens presentes na água mineral consideradas citotóxicas possuindo o gene codificador da Aerolisina. Para doze isolados de água termais, sete foram citotóxicos e onze continha esse gene. Ottaviani et al. (2011), a partir de estudos realizados com cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de alimentos e do meio ambiente (águas superficiais) na Itália, também encontraram uma maior percentagem do gene Aerolisina. Sendo este mais prevalente, nos isolados do ambiente. Em trutas, Nam e Joh (2007), também indicaram a maior prevalência da aerolisina em isolados patogênicos. A aerolisina também é considerada o principal fator de virulência em isolados de *A. veronii* para bagres (NAWAZ et al., 2010).

O gene codificador da elastase e lipase também foram identificados nos isolados de *A. hydrophila* obtidos de peixes no Vale do São Francisco. Este gene é comumente encontrado em isolados de *Aeromonas* spp. (SEN, 2005). As lípases e hidrolípases são consideradas importantes fatores de virulência em *Aeromonas* spp. pois alteram a estrutura da membrana citoplasmática dos hospedeiros e desta forma exarcebam a patogenicidade da mesma, especialmente se o gene da aerolisina está presente (NAWAZ et al., 2010). São importantes fatores extracelulares para colonização do hospedeiro e destruição de seus tecidos (CASCON et al., 2000). Song et al. (2004) demonstraram o potencial da associação da elastase aos danos provocados pela aerolisina em cultivos celulares. A capacidade das enzimas

extracelulares em provocarem lise para alimentar as células bacterianas em proliferação é muito importante para *Aeromonas* spp. (CASCON et al., 2000). O gene da lipase também foi descrito como importante fator de virulência em isolados de *Aeromonas* spp. isoladas de trutas (NAM & JOH, 2007).

A *A. hydrophila* provocou o desenvolvimento de lesões nos peixes independente do número de genes de virulência testados. Verificou-se que, a partir do terceiro dia o número de lesões foi crescente de acordo com o menor número de genes de virulência presente nas *A. hydrophila*. Uma redução no número de lesões foi observada a partir do terceiro dia nos animais inoculados com *A. hydrophila* sem e com dois fatores de virulência, contudo nos animais inoculados com isolados contendo quatro fatores de virulência o número de lesões permaneceu constante, este fato está diretamente relacionado à mortalidade, que foi maior no grupo inoculados com *A. hydrophila* contendo maior número de genes de virulência.

## 5. CONCLUSÕES

Os fatores de virulência encontram-se amplamente distribuídos entre os isolados de *A. hydrophila*, indicando o potencial patogênico para os organismos aquáticos do Vale do São Francisco. A aerolisina foi o fator de virulência presente em maior frequência nos isolados analisados.

A *A. hydrophila* possui a capacidade em causar mortalidade em alevinos de Tilápia do Nilo, independente da presença e da quantidade dos genes de virulência testados.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Samira Teixeira Leal de

Oliveira. Ao Centro Integrado de Recursos Pesqueiros (CIRPA) de Bebedouro, Petrolina – PE, pelo fornecimento de alevinos de tilápia do Nilo.

Esse trabalho possui autorização do comitê de ética da Univasf sob o número 27091053 de 06 de outubro de 2010.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA-ARREOLA, M.G.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C.; ZÚÑIGA, G.; FIGUERAS, M.J.; GARDUÑO, R. A.; CASTRO-ESCAPULLI, G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 2007. p. 877–887.

ALBERT, M.J. *et al.* Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. Isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.10, p.3785-3790, 2000.

BISCARDI, D.; CASTALDO, A.; GUALILLO, O.; DE FUSCO, R. The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *The Science of the Total Environment* 292, 2002. p. 255–263.

CASCÓN, A.; ANGUITA, J.; HERNANZ, C.; SÁNCHEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; NAHARRO, G. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.4, p.1167-1170, 1996.

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

CHACON, M. R.; SOLER, L.; GROISMAN, E. A.; GUARRO, J.; FIGUERAS M. J. Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 42, n. 3, 2004, p. 1285–1287.

CHAKRABORTY, T.; MONTENEGRO, M. A.; SANYAL, S. C.; HELMUTH, R.; BULLING, E.; TIMMIS, K. N. Cloning of Enterotoxin Gene from *Aeromonas hydrophila* Provides Conclusive Evidence of Production of a Cytotoxic Enterotoxin. *Infection and immunity*, vol. 46, n. 2 1984. p. 435-441.

CHANG, Y.-C.; WANG, J.-Y.; SELVAM, A.; KAO, S.-C.; YANG, S.-S.; SHIH, D.Y.-C. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in Northern Taiwan. *Journal of Food Protection* 71, 2008. p. 2094–2099.

CIPRIANO, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish disease leaflet*, 68, 2001.

COSTA, M. M.; DRESCHER, G.; MABONI, FRANCIELE ; MABONI, F.; WEBER, S.; SCHRANK, A. ; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, I.; VARGAS, A. C. Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental *Escherichia coli* swine isolates. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, 2010. p. 30-36.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArte, 533p. 2004.

DOOLEY, JAMES S. G.; TRUST, TREVOR J. Surface Protein Composition of *Aeromonas hydrophila* Strains Virulent for Fish: Identification of a Surface Array Protein. *Journal of bacteriology*, Vol. 170, n. 2, 1988, p. 499-506.

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

HEUZENROEDER, M.W.; WONG, C.Y.; FLOWER, R.L. Distribution of two haemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiological Letters* 174, 1999. p. 131–136.

HOWARD, S.P., GARLAND, W.J., GREEN, M.J. AND BUCKLEY, J.T. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology* 169, 1987. p. 2869-2871.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 23, p. 35–73, 2010.

JUTFELT, F., SUNDH, H., GLETTE, J., MELLANDER, L., THRANDUR BOJRNSSON, B. AND SUNDELL, K. The involvement of *Aeromonas salmonicida* virulence factors in bacterial translocation across the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), intestine. *Journal of Fish Diseases*, 31, 2008. p. 141-151.

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

LEUNG, K. Y., AND R. M. W. STEVENSON. Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.* 1988. p.56:2639–2644.

LI, J.; NI, X.D.; LIU, Y.J.; LU, C.P. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 2011.

MERINO, S. X.; RUBIRES, A.; AGUILLAR, J. F.; TOMAS, J. M.. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization *in vivo* of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb. Pathog.* 1996. p. 20:325–333.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science of the Total Environment*, 293, 2002. p. 207-218.

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, v.45, n.4, 2007. p. 297-304.

NAWAZ, M.; KHAN, S. A.; KHAN, A. A.; SUNG, K.; TRAN, Q.; KERDAHI, K.; STEELE, R. Detection and characterization of virulence and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food microbiology*, 27, 2010. p. 327-331.

OTTAVIANI, D.; PARLANI, C.; CITTERIO, B.; MASINI, L.; LEONI, F.; CANONICO, C.; SABATINI, L.; BRUSCOLINI, F.; PIANETTI, A. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 2011. p. 538–545.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, 2008. p. 311.

PEMBERTON, J. M., S. P. KIDD, AND R. SCHMIDT. Secreted enzymes of *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. 1997. p. 152:1–10.

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

SANTOS, F. G. B. Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com potencial patogênico em pacamã (*Lophosilurus alexandri* Steindachner, 1877). Pertolina, PE; UNIVASF. 2011, p. 67. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2011.

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

SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; CHOPRA, A. K. Role of Various Enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-Induced Gastroenteritis: Generation of Enterotoxin Gene-Deficient Mutants and Evaluation of Their Enterotoxic Activity. Infection and immunity, vol. 60, n. 4, 2002, p. 1924-1935.

SHA, J.; PILLAI, L.; FADL, A. A.; GALINDO, C. L.; EROVA, T. E.; CHOPRA, A. K. The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila*, Vol. 73, n. 10, 2005, p. 6446–6457.

SILVA, L. J. *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais pesados Pertolina, PE; UNIVASF. 2011, p. 60. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2011.

SUOMALAINEN, L-R.; TIIROLA, M. A.; VALTONEN, E. T. Influence of rearing conditions on Flavobacterium columnare infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 28, 2005. p. 271–277.

SONG, T.; TOMA, C.; NAKASONE, N.; IWANAGA, M. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria. Journal of Medical Microbiology 53, 2004. p. 477–482

VILCHES, S.; URGELL, C.; MERINO, S. M.; CHACON R.; SOLER, L.; CASTRO-ESCARPULLI, G. FIGUERAS, M. J.; TOMAS, JUAN M. Complete Type III Secretion

System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* Strain. Applied and environmental microbiology, Vol. 70, n. 112004, p. 6914–6919.

YU, H. B.; SRINIVASA RAO, P. S.; LEE, H. C.; VILCHES, S.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; LEUNG, K. Y. A TYPE III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. Infect. Immun. 2004. p. 72:1248–1256.

YU, H. B. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. Applied and Environmental Microbiology v.71, n.8, p.4469–4477, 2005.

ZHANG, H. B., L. H. WANG, AND L. H. ZHANG. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. p. 99:4638–4643.

## Artigo 2

### Inoculação de *Aeromonas hydrophila* em tilápia (*Oreochromis niloticus*) após a ingestão de aflatoxina

Samira Teixeira Leal de Oliveira, Mateus Matiuzzi da Costa

#### RESUMO

Este estudo objetivou verificar o efeito das aflatoxinas na alimentação de tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas hydrophila*. Foram utilizados 120 alevinos com 35 dias e  $1,55 \pm 0,005$  g de peso médio que foram distribuídos em 20 aquários, sendo cada unidade experimental constituída por um aquário de 60 L com 6 alevinos. Foram utilizados níveis crescentes de inclusão da aflatoxina 0,350; 0,757; 1,177 g kg ração<sup>-1</sup> e uma ração testemunha (sem aflatoxina), em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Para o estudo do efeito da aflatoxina sobre a virulência de *A. hydrophila* em tilápias do Nilo, foi considerando como tratamentos, o grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina (1); ração testemunha inoculados com *Aeromonas hydrophila* (2); ração contendo 0,350 g kg ração<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (3); ração contendo 0,757 g kg ração<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (4); ração contendo 1,177 g kg ração<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (5). Utilizando-se cinco tratamentos e quatro repetições. No efeito das aflatoxinas sobre o desempenho de tilápias do Nilo não foram encontrados diferenças significativas nos parâmetros estudados. A sobrevivência e o comprimento total dos alevinos foram influenciados em função dos tratamentos ( $P < 0,05$ ), com os valores maiores para o tratamento 1. A conversão alimentar aparente (CAA) também foi menor no tratamento 1 em comparação ao tratamento 5. Foi possível verificar que doses de até 1,177 g kg ração<sup>-1</sup> de aflatoxina, não influenciou a sobrevivência e desempenho de alevinos de tilápias do Nilo. Entretanto a ação sinérgica de aflatoxinas e *Aeromonas hydrophila*, mostrou-se eficaz em provocar a morte dos peixes experimentais.

Palavras chaves: tilápia do Nilo, micotoxina, inoculação, *Aeromonas hydrophila*

#### ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of aflatoxins in the diet of Nile tilapia inoculated with *Aeromonas hydrophila*. 120 fingerlings were used for 35 days and  $1.55 \pm 0.005$  g mean weight were distributed in 20 tanks, each experimental unit consists of a 60 L aquarium with 6 fry. Increasing levels of inclusion of aflatoxin 0.350, 0.757 and 1.177 g kg<sup>-1</sup> diet and a control diet (no aflatoxin) in a completely randomized design with four treatments and five repetitions. To study the effect of aflatoxin on the virulence of *A. hydrophila* in Nile tilapia, was considered as treatments, the group of Nile tilapia receiving the control diet were inoculated with saline solution (1); control diet inoculated with *A. hydrophila* (2), 0.350 g/kg diet containing aflatoxin-1 inoculated with *A. hydrophila* (3), 0.757 g/kg diet containing aflatoxin-1 inoculated with *A. hydrophila* (4); 1.177 g/kg diet containing aflatoxin-1 inoculated with *A. hydrophila* (5). With five treatments and four replications. The effect of aflatoxin on the performance of Nile tilapia were not found significant differences in the parameters studied. Survival and total length of the fingerlings were influenced by the treatments ( $P < 0.05$ ), with higher values for treatment 1. The feed conversion ratio (CAA) was also lower in treatment 1 compared to treatment 5. It was noted that doses of up to 1.177 g/kg feed aflatoxin-1 did not influence the survival and performance of Nile tilapia fingerlings. However, the synergistic action of aflatoxins and *A. hydrophila*, was effective in causing the death of the experimental fish.

Keywords: tilapia of the Nile, micotoxina, inoculation, *Aeromonas hydrophila*

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura mundial, apesar da longa tradição e práticas em alguns países, é ainda considerada um setor de produção de alimento jovem, mas que tem crescido rapidamente nos últimos 50 anos. No período de 1970-2008 a produção de pescado para o consumo subiu a uma taxa média anual de 8,3%. Na América Latina, o Brasil encontra-se em destaque, sendo conceituado hoje, como um dos países com maior potencial hídrico em todo o mundo (FAO, 2010).

Com o sistema intensivo de cultivo de peixes, pode-se obter alta produtividade, algumas vezes acima de 30 toneladas por hectare/ano (BRASIL, 2010). Embora esse sistema seja muito promissor, estão mais sujeitos a agentes estressores, tais como deterioração e/ou variação da qualidade da água, às interações agonísticas, ao manuseio de cultivo e ao transporte (PAVANELLI et al., 2008). Outro grande fator é a nutrição inadequada, bem como a presença de micotoxinas nas rações, a

qual pode resultar em supressão da resposta imune nos peixes (CYRINO et al., 2004).

Aflatoxinas são produtos metabólicos tóxicos, produzidos por *Aspergillus flavus* (Bennett & Klich, 2003). São contaminantes comuns de alimentos como o milho, o farelo de amendoim e o farelo de algodão, que podem ser utilizados na fabricação de rações (KUBITZA, F. & KUBITZA, L. et al., 2004). Possuem a propriedade de tornar os peixes mais susceptíveis a estresse de qualquer origem, apresentando manifestações toxicológicas e efeito sobre o sistema imune a partir de sua ingestão, assim como podem ocasionar efeitos crônicos e agudos (MILLER & TRENHOLM, 1997).

Quando a homeostase é perturbada, o peixe torna-se altamente vulnerável a infecção, a qual pode ser provocada por patógenos oportunistas, obrigatórios ou facultativos, que podem estar presente no ambiente de cultivo (ROBERTS, 1981). O envolvimento de *Aeromonas* spp. em enfermidades é geralmente associado a outras condições, e sua patogenicidade parece estar relacionada com estresse de hospedeiros já debilitados. Espécies de *Aeromonas* spp. mesófilas principalmente *A. hydrophila*, têm sido associadas à maior mortandade de peixes em todo o mundo na última década, resultando em enormes perdas econômicas (JANDA & ABBOTT, 2010).

Hoje, o gênero *Aeromonas* é considerado sinônimo de água e ambientes aquáticos, sendo isolada desde águas de beber a águas residuais e de esgoto em vários estágios de tratamento (JANDA & ABBOTT, 2010). Considerando o risco de que ingredientes utilizados nas rações de peixes possam apresentar níveis elevados de aflatoxinas, torna-se importante então, o seu estudo na piscicultura.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Aeromonas hydrophila*, após o fornecimento de níveis crescentes de aflatoxina em rações para alevinos, sexualmente revertidos, de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1. Local

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

## 2.2. Animais experimentais

Foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada, sexualmente revertidos, na fase inicial. Tais alevinho tinham 35 dias de idade, provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros (CIRPA) de Bebedouro, Petrolina – PE. Foram selecionados 120 animais com peso médio de  $1,55 \pm 0,005\text{g}$  e distribuídos em 20 quários com 60 L de volume útil, em um delineamento inteiramente casualizado. Sendo então, cada unidade experimental constituída por um aquário com seis alevinos.

Os aquários possuíam aeração constante, por meio de pedras micro-porosas ligadas a mini-compressores de ar. O manejo experimental consistia na sifonagem diária pela manhã (7h00) e tarde (16h30min), com a remoção de cerca de 40% da água, onde além da troca de água eram também retiradas as fezes e eventuais restos de ração. A limpeza interna das paredes dos tanques era feita semanalmente para evitar o aparecimento de perifíton.

## 2.3. Rações

Quatro rações foram formuladas com 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível. Para a fabricação das rações os alimentos foram moídos em peneira de 1 mm. A composição das rações experimentais encontram-se na Tabela 1. Posteriormente, foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica

experimental, e então os peletes foram secos em estufa de ventilação forçada por 24h a 56°C. Após secos, foram quebrados e assim, adequado o tamanho do pélete à boca dos alevinos.

O arraçoamento foi feito três vezes ao dia às 8h00, 12h00 e 17h00. Semanalmente, as unidades experimentais eram pesadas para a adequação da quantidade de ração fornecida. Sendo que, a ração fornecida foi a mesma nas duas fases experimentais, para seus devidos tratamentos.

**Tabela 1.** Composição percentual das rações experimentais.

Ingredientes <sup>1</sup>	Aflatoxina g kg ração <sup>-1</sup>			
	0,00	0,350	0,757	1,177
Farelo de soja	70,79	70,79	70,79	70,79
Milho	16,70	16,70	16,70	16,70
Óleo de soja	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicálcico	2,80	2,80	2,80	2,80
Calcário calcítico	0,20	0,20	0,20	0,20
Micotoxina	0,00	350	757	1177
Suplemento mineral e vitamínico <sup>2</sup>	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,50	0,50	0,50	0,50
Butil hidroxi tolueno (BHT)	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

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

A aflatoxina adicionada às rações foi cedida pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal Santa Maria. Apresentava-se como um pó fino, e a sua inclusão foi realizada mediante uma pré mistura na fração do milho, antes da mistura dos demais ingredientes das rações.

## 2.4. Efeito das aflatoxinas sobre o desempenho de tilápias do Nilo

Os tratamentos utilizados para avaliar o efeito das aflatoxinas nos alevinos de tilápia do Nilo, constituiu-se de quatro rações, uma testemunha (sem adição de aflatoxina) e outras três com níveis crescentes de aflatoxina (0,350; 0,757 e 1,177 g kg ração<sup>-1</sup>). O modelo experimental foi arranjado em quatro tratamentos e cinco repetições. A ração foi fornecida em um nível de 8% da biomassa.

Diariamente, antes das sifonagens, era aferida a concentração de oxigênio, temperatura, condutividade elétrica e pH da água dos aquários (medidor multiparâmetros modelo HI 9828, HANNA Instruments). Após 30 dias experimentais, os animais foram pesados para determinação dos parâmetros de crescimento, ganho de peso e conversão alimentar aparente.

## **2.5. Efeito da aflatoxina sobre virulência de *A. hydrophila* em tilápias do Nilo**

Para este experimento foram utilizados cinco tratamentos e quatro repetições. Considerando como tratamentos, o grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina (1); ração testemunha inoculados com *Aeromonas hydrophila* (2); ração contendo 0,350 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (3); ração contendo 0,757 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (4); ração contendo 1,177 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (5). Cada unidade experimental também constou de um aquário contendo seis peixes. Os peixes foram arraçoados à vontade.

A inoculação das *Aeromonas hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo, foi realizada por meio de um preparado de inóculo bacteriano com diluição em solução salina estéril a concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Essa solução foi injetada via intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe experimental, assim como a solução salina pura, foram aplicadas na proporção de 0,5 ml/animal.

Os parâmetros físico-químicos da água dos aquários também foram aferidos nesse experimento. Antes do procedimento de inoculação de *A. hydrophila* nos peixes, foi feito um cultivo da água dos aquários em meio Agar sangue para verificar possível presença desta bactéria no próprio ambiente aquático. Ainda na segunda fase, a partir da inoculação, os animais foram avaliados quanto a eventuais

manifestações de infecção por *Aeromonas hydrophila* (lesões externas, ascite, etc.) e mortalidade. Ao final do período experimental, depois de anestesiados com benzocaína (100mg/L) e eutanasiados por secção medular, os peixes de cada unidade experimental, foram pesados e medidos para a determinação dos parâmetros de desempenho e carcaça. Dois peixes de cada unidade experimental tiveram o seu rim extraído para a determinação do índice hepato-somático (IHS),  $((\text{peso do fígado} / \text{peso corporal}) \times 100)$  e de um deles, foi feito cultivo bacteriano do rim em meio ágar Triptona de Soja (TSA), assim como foram feitos o cultivo de todos os peixes que morreram em função da inoculação, a partir do rim e lesões ulcerativas.

Depois de avaliado todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, sobrevivência, parâmetros de carcaça e IHS, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos à análise de variância, (One-way ANOVA) e verificando efeito realizou-se o teste Tukey ( $p < 0,05$ ) caso pelo software *Statistica 7.0*.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Efeito das aflatoxinas sobre o desempenho de tilápias do Nilo**

##### *3.1.1. Água dos aquários e cultivo bacteriano*

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram, respectivamente,  $27,28 \pm 0,06$  °C e  $28,14 \pm 0,12$  °C;  $7,24 \pm 0,04$  e  $7,14 \pm 0,04$ ;  $6,94 \pm 0,11$  e  $6,73 \pm 0,17$  mg/L;  $68,87 \pm 2,75$  e  $63,71 \pm 3,68$   $\mu\text{Sm/cm}$ . Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

##### *3.1.2. Sobrevivência, crescimento e conversão alimentar*

Durante o período experimental a sobrevivência foi de 100% em todas as unidades. Os valores médios do peso inicial, crescimento e conversão alimentar dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo níveis crescentes de aflatoxina encontram-se na Tabela 2. O peso inicial dos alevinos utilizados no experimento foi estatisticamente semelhante ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. As médias de peso final, ganho de peso e conversão alimentar não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em função do aumento dos níveis de aflatoxina ( $P>0,05$ ) nas rações.

**Tabela 2.** Valores médios dos parâmetros de desempenho e conversão alimentar aparente (CAa) dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos à rações contendo níveis crescentes de aflatoxinas

Parâmetros	Aflatoxina g.kg ração <sup>-1</sup>				P*
	0,00	0,350	0,757	1,177	
Peso inicial (g)	1.55 ± 0,01	1.55 ± 0,00	1.55 ± 0,01	1.55 ± 0,01	0,25
Peso final (g)	8,52 ± 0,58	8,26 ± 0,99	8,39 ± 0,80	8,00 ± 1,01	0,81
Ganho de peso (g)	6,96 ± 3,48	6,71 ± 5,95	6,83 ± 4,81	6,45 ± 6,06	0,81
CAa	1,08 ± 0,04	1,11 ± 0,08	1,09 ± 0,05	1,13 ± 0,09	0,56

\*P = P-valor

### 3.2. Efeito da aflatoxina sobre virulência de *A. hydrophila* em tilápias do Nilo

#### 3.2.1. Água dos aquários e cultivo bacteriano

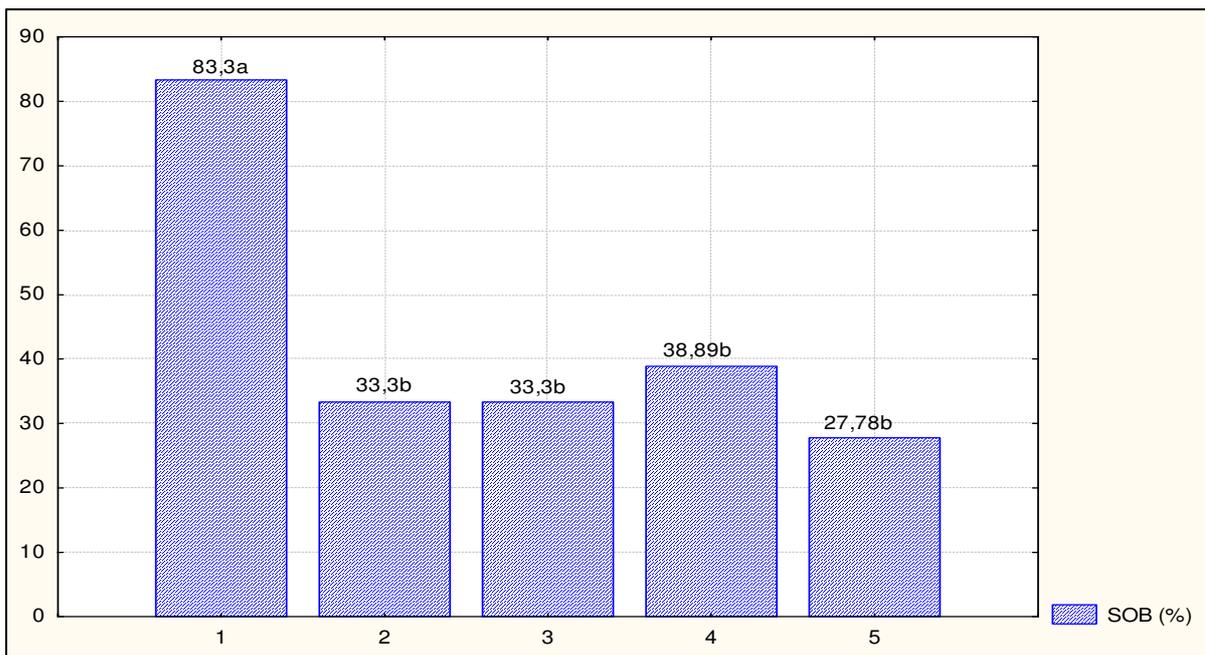
Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram, respectivamente,  $27,31 \pm 0,09$  °C e  $28,14 \pm 0,12$  °C;  $7,2 \pm 0,05$  e  $7,14 \pm 0,05$ ;  $7,14 \pm 0,15$  e  $6,76 \pm 0,15$  mg/L;  $86,81 \pm 0,63$  e  $82,58 \pm 4,5$  µSm/cm. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos ( $P>0,05$ ).

Não houve crescimento de *Aeromonas* spp. a partir da água dos aquários. Do cultivo bacteriano do rim e lesões ulcerativas, em meio TSA, a partir dos peixes mortos durante o período experimental, houve crescimento de colônias bacterianas

de gênero *Aeromonas*, no entanto, o mesmo não foi verificado para o cultivo a partir do rim dos alevinos na finalização do experimento.

### 3.2.2. Sobrevivência, crescimento e conversão alimentar

Os valores percentuais da sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à rações contendo níveis crescentes de aflatoxina e inoculação de *A. hydrophila* encontram-se na Figura 1. A sobrevivência foi influenciada em função dos tratamentos, apresentando diferença significativa maior para o tratamento de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculado com solução salina (T1) ( $P < 0,05$ ), em comparação aos demais tratamentos que não diferiram entre si.



**Figura 1.** Sobrevivência dos alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila*. - (1) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina; (2) ração testemunha inoculados com *A. hydrophila*; (3) ração contendo  $0,350 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*; (4) ração contendo  $0,757 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*; (5) ração contendo  $1,177 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*.

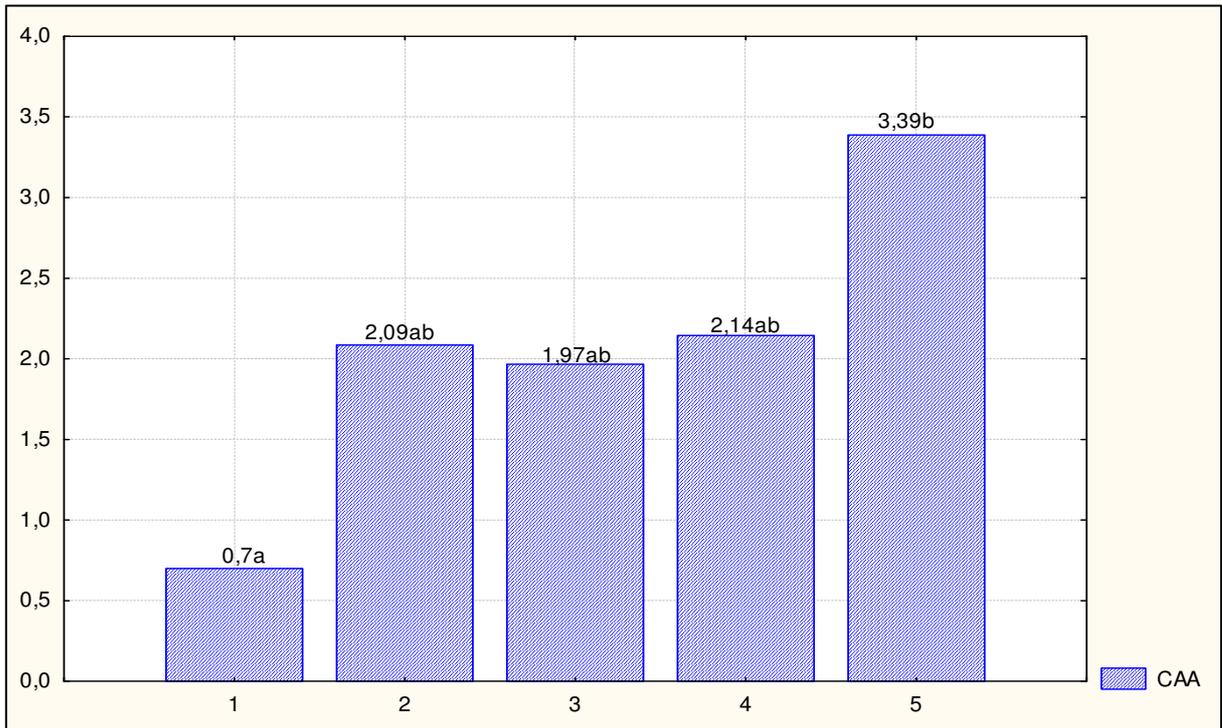
Os valores médios de peso final e ganho de peso dos alevinos encontram-se na Tabela 3. As médias de peso final e ganho de peso não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em função das doses de aflatoxinas ( $P > 0,05$ ) nas rações e inoculação de solução salina ou *A. hydrophila*.

**Tabela 3.** Peso e ganho de peso médio de tilápias do Nilo submetidos a rações contendo aflatoxina, inoculados com *A. hydrophila* (2, 3, 4 e 5) e solução salina (1)

Tratamentos <sup>1</sup>	Peso final (g)	Ganho de peso (g)
1	17,27 ± 1,00	15,72 ± 1,00
2	17,33 ± 2,36	15,77 ± 2,36
3	17,98 ± 2,22	16,43 ± 2,22
4	16,42 ± 1,80	14,87 ± 1,80
5	14,51 ± 1,30	12,97 ± 1,30
p-valor	0,15	0,15

<sup>1</sup>tratamento de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina (1); ração testemunha inoculados com *A. hydrophila* (2); ração contendo 0,350 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (3); ração contendo 0,757 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (4); ração contendo 1,177 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (5)

Os valores médios da conversão alimentar aparente (CAA) dos alevinos de tilápias do Nilo, encontram-se na Figura 2. Seus valores apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos que receberam ração testemunha inoculada com solução salina (Tratamento 1) e o grupo de alevinos que receberam ração contendo 1,177 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila* (Tratamento 5), sendo estatisticamente menor para o Tratamento 1.



**Figura 2.** Conversão alimentar aparente dos alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila* - (1) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina; (2) ração testemunha inoculados com *A. hydrophila*; (3) ração contendo  $0,350 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*; (4) ração contendo  $0,757 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*; (5) ração contendo  $1,177 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*.

### 3.2.3. Características de rendimento de carcaça

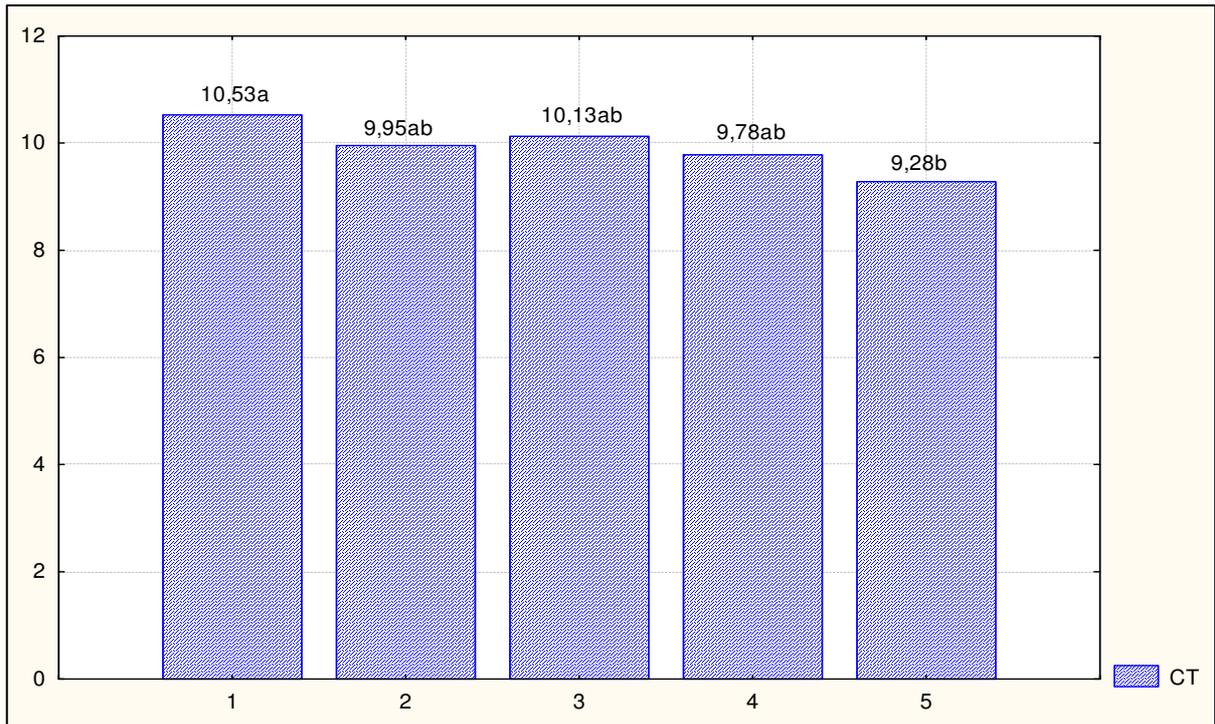
Os resultados finais dos parâmetros de comprimento padrão, largura, altura, largura corporal e rendimento de carcaça com e sem cabeça dos alevinos encontram-se na Tabela 4. As médias dos parâmetros corporais, quanto ao comprimento padrão, largura, altura, largura corporal e rendimento de carcaça com e sem cabeça não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em função do aumento dos níveis de aflatoxina ( $P > 0,05$ ) nas rações e inoculações.

**Tabela 4.** Valores finais médios dos parâmetros corporais das tilápias do Nilo submetidos à desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila*

Parâmetros	Tratamentos <sup>1</sup>					P*
	1	2	3	4	5	
Comprimento padrão (cm)	8,24 ± 0,09	8,38 ± 0,43	8,35 ± 0,25	8,18 ± 0,53	7,67 ± 0,26	0,11
Largura (cm)	1,53 ± 0,03	1,53 ± 0,08	1,55 ± 0,10	1,48 ± 0,02	1,38 ± 0,11	0,06
Altura final (cm)	3,05 ± 0,07	2,98 ± 0,02	3,15 ± 0,20	2,96 ± 0,08	2,84 ± 0,22	0,15
Rendimento de carcaça (g)	15,32 ± 0,91	15,77 ± 1,69	15,86 ± 1,91	14,60 ± 1,49	13,90 ± 2,64	0,61
Rendimento de carcaça sem cabeça (g)	10,84 ± 0,78	11,45 ± 1,51	11,44 ± 1,58	10,22 ± 1,25	8,67 ± 1,01	0,06

\*P = P-valor; <sup>1</sup>tratamento de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina (1); ração testemunha inoculados com *A. hydrophila* (2); ração contendo 0,350 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (3); ração contendo 0,757 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (4); ração contendo 1,177 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (5)

O resultado final de comprimento total dos animais experimentais está representado na Figura 3 (P<0,05). O comprimento total do Tratamento 1 (grupos que receberam ração testemunha inoculada com solução salina), foi significativamente maior (P<0,05) que o Tratamento 2 (grupo de alevinos que receberam ração contendo 1,177 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *Aeromonas hydrophila*), sendo estes, estatisticamente semelhantes aos demais.



**Figura 3.** Comprimento total (cm) dos alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos a desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila* - (1) grupo de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina; (2) ração testemunha inoculados com *A. hydrophila*; (3) ração contendo  $0,350 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*; (4) ração contendo  $0,757 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*; (5) ração contendo  $1,177 \text{ g.kg}^{-1}$  de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila*.

#### 3.2.4. Índice hepatossomático e fator de condição

Os valores do índice hepatossomático e fator de condição dos alevinos de tilápia estão representados na Tabela 5. Não houve efeito significativo no índice hepatossomático e fator de condição ( $P > 0,05$ ) nos animais, em função dos tratamentos.

**Tabela 5.** Índice hepatossomático (IHS) e fator de condição (FC) de tilápia do Nilo submetidos à desafio com doses crescentes de aflatoxinas e inoculação de *A. hydrophila*

Parâmetros	Tratamentos <sup>1</sup>					P*
	1	2	3	4	5	
IHS	1,25 ± 0,4	1,14 ± 0,34	1,98 ± 0,62	1,42 ± 0,22	1,35 ± 0,55	0,24
FC	1,75 ± 0,03	1,48 ± 0,15	1,73 ± 0,02	1,77 ± 0,25	1,82 ± 0,11	0,11

\*P = P-valor; <sup>1</sup>tratamento de alevinos de tilápia do Nilo recebendo ração testemunha inoculados com solução salina (1); ração testemunha inoculados com *A. hydrophila* (2); ração contendo 0,350 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (3); ração contendo 0,757 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (4); ração contendo 1,177 g.kg<sup>-1</sup> de aflatoxina inoculados com *A. hydrophila* (5)

#### 4. DISCUSSÃO

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

A análise dos parâmetros de desempenho e carcaça revelou não haver diferença entre o grupo alimentado com aflatoxina e o controle. Deng et al. (2010), ao avaliar o efeito de aflatoxinas na alimentação de tilápias por um período de 20 semanas, também não observaram efeitos tóxicos quando esta foi administrada em concentrações de 1,6 mg/kg de dieta e, atribuíram isto às boas condições de cultivo. Contudo, El-Sayed & Khalil (2009) comprovaram efeitos tóxicos agudos e de alteração de comportamento em sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*), alimentados com aflatoxinas nas concentrações de 0.018 mg/kg. Estas concentrações de aflatoxinas foram menores que as utilizadas em nosso estudo. As quantidades de aflatoxinas utilizadas no presente estudo correspondiam aos valores estimados de DL<sub>50</sub> para todas as espécies animais (0,3-9,0 mg/kg) (MCKEAN et al., 2004).

Segundo Tuan et al. (2002), doses acima de 2,5 mg de aflatoxina/kg de dieta para a tilápia do Nilo, podem afetar negativamente parâmetros de crescimento, sendo a mortalidade, associada a ingestão de aflatoxinas observadas em doses acima de 100 mg/kg de ração. Lopes et al. (2005), observaram diminuição no

crescimento de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com ração contendo aflatoxina na concentração de 0,204 g/kg. Contudo, nenhum efeito foi observado sobre a sobrevivência dos peixes, mesmo quando doses de 1,177 g/kg de ração foram administradas.

A sensibilidade dos peixes às micotoxinas é variável, sendo a espécie truta arco-íris, a que apresenta maior sensibilidade (BAILEY et al., 1996). Arana et al. (2002) demonstraram que o genótipo das trutas pode afetar significativamente o efeito das aflatoxinas sob os parâmetros de crescimento e ganho de peso. O bagre é um peixe que apresenta resistência (JANTRAROTAI & LOVELL, 1991), o que também foi comprovado por Lopes et al. (2005) ao avaliar o efeito das aflatoxinas sobre jundiás. Isto aponta a importância do efeito da espécie e de componentes genéticos sobre os efeitos provocados pelas micotoxinas em peixes e, estes podem explicar alguns dos resultados descritos no presente estudo.

O isolado de *A. hydrophila* utilizado no presente estudo foi eficaz em provocar a morte dos peixes, o que está de acordo com vários relatos da literatura que apontam esta bactéria como o principal patógeno de organismos aquáticos (BOIJINK & BANDÃO, 2001 e 2004; KUBITZA, F. & KUBITZA, L., 2004; PAVANELLI, et al., 2008; PLUMB & HANSON, 2008). Nas condições do presente estudo a morte dos animais ocorreram no período de 24 horas sendo que, os animais submetidos à necropsia apresentaram ascite, lesões externas hemorrágicas e purulentas. Em 72 horas após a inoculação também foram observadas a necrose da nadadeira caudal. Esses achados são semelhantes aos descritos para infecções septicêmicas ocasionadas por *Aeromonas* spp. (BOIJINK et al., 2001; BOIJINK & BANDÃO, 2001 e 2004).

Após inoculação bacteriana, diferenças significativas foram obtidas entre o grupo controle e os alimentados com aflatoxinas na dose de 1,177 g.kg<sup>-1</sup> para os parâmetros de conversão alimentar e comprimento total. Estes resultados apontam para a ação sinérgica entre as aflatoxinas e *Aeromonas hydrophila*. O efeito das aflatoxinas sobre o fígado e sistema imunológico é bem conhecido, causam uma série de danos ao metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídeos (MALLMANN et al., 1994; ROSMANINHO et al., 2001; BENNETT e KLICH, 2003). Os peixes que recebem aflatoxinas se tornam sensíveis a fatores estressantes do meio ambiente e de origem microbiana (ROSMANINHO et al., 2001; LOPES et al., 2005). Acreditamos que o mesmo possa ter ocorrido em nosso estudo, o que reduziu os

parâmetros de conversão e comprimento total. No presente estudo, não foi verificada alteração no índice hepatossomático o que seria sugestivo de lesão hepática, e não foi possível realizar a análise microscópica deste órgão, a qual é associada a danos causados por aflatoxinas.

Atualmente sistemas de produção intensivos de tilápia do Nilo, estão associados a estresse, super lotação e administração de dietas contendo produtos de origem vegetal (CYRINO et al., 2004; PAVANELLI et al., 2008). Este fato predispõe os peixes à contaminação por aflatoxinas, sendo descritas como contaminantes da ração produzida para vários organismos aquáticos, podendo chegar a doses de 3,388 g (ABDELHAMID, et al., 1998; FARABI et al., 2006). Este é um fato preocupante, principalmente quando consideradas os efeitos da interação deste contaminante com ictiopatógenos, como vírus e bactérias (ROSMANINHO et al., 2001).

## 5. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível verificar que doses de até 1,177 g.kg ração<sup>-1</sup> de aflatoxina, não influencia no desempenho e rendimento de carcaça de alevinos de tilápias do Nilo. Entretanto, a ação sinérgica de aflatoxinas e *Aeromonas hydrophila*, influencia fortemente na sua mortalidade.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Samira Teixeira Leal de Oliveira. Ao Centro Integrado de Recursos Pesqueiros (CIRPA) de Bebedouro, Petrolina – PE, pelo fornecimento de alevinos de tilápia do Nilo.

Esse trabalho possui autorização do comitê de ética da Univasf sob o número 27091053 de 06 de outubro de 2010.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMID, A.M.; KHALIL, F.F.; RAGAB, M.A. Problem of mycotoxins in fish production. *Egypt J. Nutr. Feeds* 1 (1), 1998. p. 63-71.

ARANA, S.; TABATA, Y.A.; SABINO, M. Differential effect of chronic aflatoxin B<sub>1</sub> intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.34, 2002. p.253-263.

BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E.; HENDRICKS, J. D. Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environ. Health Persp.* 1996. p. 104: 5-21.  
BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, Vol. 16, n. 3, 2003. p. 497-516.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Avaliação de suspensões bacterianas de *Aeromonas hydrophila*, em juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Biodiversidade Pampeana*, PUCRS, Uruguaiana, 28, 2004. p. 2:3-8.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; RENOSTO, A. V. Inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em jundiá, *Rhamdia quelen* (teleostei: pimelodidae), *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.3, 2001. p. 497-501.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D.A. Inoculação Bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a Sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.3, 2001. p. 503-507.

BRASIL - MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Produção Pesqueira e Aquícola – Estatística 2008 e 2009. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso: 19/04/2011.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArte, 2004. p. 533.

DENG, S.; TIAN, L.; LIU, F.; JIN, S.; LIANG, G.; YANG, H.; DU, Z.; LIU, Y. Toxic effects and residue of aflatoxin B<sub>1</sub> in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture*. 307, 2010. p. 233–240.

EL-SAYED, Y.S.; KHALIL, R.H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B<sub>1</sub> in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food and Chemical Toxicology* 47, 2009. p. 1606-1609.

FAO (2010) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010 (in Spanish)*. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome. p. 242

FARABI, S.M.; YOUSEFIAN, M.; HAJIMORADLOO, A. Aflatoxicosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. *J. Appl. Ichthyol.* 22 (Suppl. 1), 2006. p. 234-237.

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

JANTRAROTAI, W.; LOVELL, B.T. Subchronic toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> to channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.2, 1991. p. 248-275.

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

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 4. ed. Jundiaí, SP, 2004. p. 118.

LOPES, P. R. S.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.40, n.10, 2005. p. 1029-1034.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; WENTZ, L. Aflatoxinas – aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. *Ciência Aural*, Santa Maria, v. 24, n. 3, 1994 . p. 635-643.

MCKEAN, C.; TANG, L.; TANG, M.; BILLAM, M.; WANG, Z.; THEODORAKIS, C.W.; KENDALL, R.J.; WANG, J.S. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*. 44, 2004. p. 868-876.

MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*. Minnesota, USA: Eagan, 1997. p. 552.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3ª ed. Maringá: Eduem, 2008. p. 311.

PLUMB, J. A.; HANSON, A. *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. Blackwell Publishing Ltd. 3 ed. 2011. p. 506.

ROBERTS, R. J. *Patologia de los peces*. Edição espanhola: Cachafeiro, M. C. B. 1 ed. Madrid, 1981. p. 365.

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v.68, 2001. p.107-114.

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

TUAN, N. A.; GRIZZLE, J. M.; LOVELL, R. T.; MANNING, B. B.; ROTTINGHAUS, G. E. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B<sub>1</sub>. *Aquaculture* 212, 2002. p. 311-319.

## Artigo 3

### ***Ascophyllum nodosum* na alimentação de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito após a inoculação de *Aeromonas hydrophila***

Samira Teixeira Leal de Oliveira, Mateus Matiuzzi da Costa

#### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da farinha de alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum* (FAM), em tilápias do Nilo, sob desafio sanitário com inoculação de *Aeromonas hydrophila*. O experimento foi realizado durante um período de 40 dias, onde 120 alevinos de tilápia do Nilo, com 40 dias e  $2,68 \pm 0,01$ g de peso médio foram distribuídos em 20 aquários, em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Sendo cada unidade experimental constituída por um tanque plástico de 36 L com 3 alevinos. Foi fornecida uma ração com inclusão da farinha da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (FAM) 20 g kg ração<sup>-1</sup> e uma ração testemunha (sem FAM). A inoculação foi feita por meio de um preparado de inóculo bacteriano com diluição em solução salina estéril a concentração de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Exceto a largura, que foi maior para o tratamento com o fornecimento da FAM (P<0,05), esta não influenciou nos parâmetros de desempenho dos alevinos. Após a inoculação, não foi verificada influência nos parâmetros de desempenho, mas a ocorrência de lesões nos animais inoculados com *A. hydrophila*, alimentados com FAM, foram menores, estes também apresentaram uma regressão no número de lesões em um período de tempo menor do que o do grupo controle. A farinha de alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum*, reduziu o número de lesões no peixes em menor tempo quando comparado ao controle.

Palavras chave: aditivo alimentar, *Oreochromis niloticus*, desafio sanitário, *Aeromonas hydrophila*

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the flour brown seaweed *Ascophyllum nodosum* in Nile tilapia under health challenge inoculated with *Aeromonas hydrophila*. The experiment was conducted over a period of 40 days, where 120 of the Nile tilapia, with 40 days and  $2.68 \pm 0.01$  g average weight were distributed in 20 tanks in a completely randomized design with five treatments and five repetitions. As each experimental unit consists of a plastic tank of 36 L with 3 fry. Was provided with a ration of flour inclusion of seaweed *Ascophyllum nodosum*

(FAM) 20 g kg<sup>-1</sup> diet and a control diet (no MAF). Inoculation was made through a bacterial inoculum prepared with dilution in sterile saline solution concentration of 10<sup>6</sup> CFU / ml. Except for the width, which was higher for treatment with the provision of the FAM (P <0.05), this did not influence the performance parameters of the fingerlings. After inoculation, was not observed influence on performance parameters, but the occurrence of lesions in animals inoculated with *A. hydrophila*, fed with FAM, were smaller, they also showed a decline in the number of lesions in a shorter time period than the control group. Flour brown seaweed *Ascophyllum nodosum*, reduced the number of lesions in fish in less time when compared to control.

Keywords: alimentary additive, *Oreochromis niloticus*, sanitary challenge, *Aeromonas hydrophila*

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura contemporânea é apontada como um mercado estratégico para o desenvolvimento sustentável, produção de alimentos e ampliação de fronteiras inexploradas no Brasil (FIGUEIREDO & LEAL, 2008). Fazendo parte desse contexto, o Semiárido nordestino, apresenta corpos d'água, como o rio São Francisco, açudes, canais de irrigação e barragens pouco exploradas, que apresentam áreas potenciais de cultivo de espécies de peixes tropicais (MEURER et al., 2009); aliada à sua condição climática, que é marcada por apresentar altas temperaturas durante a maior parte do ano e, solos característicos com boa fertilidade química e pH normalmente em torno da neutralidade.

A atividade pesqueira, do ponto de vista social, pode se tornar uma fonte de renda importante para a população local, em especial as ribeirinhas, como é o caso dos pescadores artesanais. As tilápias constituem o segundo grupo de peixes de maior importância na aquicultura (EL-SAYED, 2006) e o seu cultivo e comércio tem se mostrado como uma das atividades agropecuárias de maior crescimento mundial. O mercado de filés está abastecido cada vez mais com espécies de água doce, em especial, às tilápias (FAO, 2010).

Com o crescimento da exploração pesqueira, é evidenciado o aumento da ocorrência de enfermidades em peixes, uma vez que sistemas intensivos de cultivo favorecem a fatores que prejudicam a homeostasia dos animais (PAVANELLI et al., 2008). Surtos epizoóticos, são observados com frequência e as bactérias, dentre os

vários patógenos, provavelmente constituem o grupo de agentes etiológicos economicamente mais significativa (FRERICHS & MILLAR, 1993). Dentre estes agentes, destacam-se as bactérias do gênero *Aeromonas*. O envolvimento de *Aeromonas* em enfermidades é geralmente associado a outras condições, e sua patogenicidade parece estar relacionada com estresse aos hospedeiros já debilitados.

As bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes naturalmente no ecossistema aquático, e fazem parte da flora microbiana normal dos peixes (PAVANELLI et al., 2008). Estes microorganismos podem causar enfermidades em animais peilotérmicos e homeotérmicos, incluindo o homem (ROBERTS, 1981). Estão associadas à hemorragia septicêmica em peixes de água doce (CYRINO et al., 2004) e gastroenterites transmitidas aos seres humanos pelo contato e consumo de carne e água contaminadas (ABDULLAH et al., 2003).

O controle de infecções em peixes, tem tido um sucesso limitado na prevenção ou cura em ambientes aquáticos, principalmente quando da utilização de drogas antimicrobianas. Atualmente, buscam-se alimentos funcionais, para combater o aparecimento destas enfermidades, visto que a utilização das drogas antimicrobianas (promotores de crescimento) está sendo evitada, principalmente por imposição de barreiras comerciais em mercados importantes, como União Européia, em função do seu efeito residual na carne, impacto ambiental e o possível aparecimento de resistências transferíveis.

Produtos derivados de algas marinhas, como a farinha de *Ascophyllum nodosum*, estão sendo testados na nutrição animal como alimento funcional. A *A. nodosum* é uma alga marinha marrom, e seu uso vem provando uma melhora relacionada ao desempenho, imunidade e qualidade da carne para animais terrestres (KANNAN et al., 2007a; KANNAN et al., 2007b; BRANDEN et al., 2007; ARCHER, et al., 2008; GARDNER et al., 2008), assim como para peixes (NAKAGAWA et. al., 1997; MEURER et al., 2010; ALVES FILHO, 2010).

Nessas condições, visto o ranking que a tilápia do Nilo ocupa na piscicultura mundial, e os benefícios que a farinha da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (FAM) pode lhes proporcionar, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito da farinha de alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum*, em tilápias do Nilo, sob desafio sanitário com inoculação de *Aeromonas hydrophila*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Condições experimentais

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, do Curso de Zootecnia, no *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) de Petrolina, com o objetivo de testar o efeito da farinha da alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum* (FAM), em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sexualmente revertidos, da linhagem chitralada, sob desafio sanitário, com inoculação de *Aeromonas hydrophila*.

Do lote de alevinos de tilápia do Nilo, sexualmente revertidos, com 40 dias de idade, foram selecionados 120 animais com peso médio de  $2,68 \pm 0,01\text{g}$  e distribuídos em 20 quários com 60 L de volume útil, em um delineamento experimental, inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Os alevinos foram provenientes de um criatório comercial de peixes instalado em Juazeiro – BA. Considerando cada unidade experimental um aquário contendo seis peixes e, que os tratamentos consistiram de quatro grupos sendo dois que receberam ração testemunha, um inoculado com solução salina (Tratamento1) e outro inoculado com *A. hydrophila* (Tratamento 3) e; dois grupos que foram alimentados com ração contendo farinha de alga marrom *A. nodosum*, sendo um deles inoculado com solução salina (Tratamento2) e outro inoculado com de *A. hydrophila* (Tratamento 4).

Os aquários possuíam aeração constante, por meio de pedras micro-porosas ligadas a mini-compressores de ar. O manejo experimental consistia na sifonagem diária pela manhã (7h00) e tarde (16h30min), com a remoção de cerca de 40% da água, onde além da troca de água eram também retiradas as fezes e eventuais restos de ração. A limpeza interna das paredes dos tanques era feita semanalmente para evitar o aparecimento de perifíton.

## 2.2. Rações

Quatro rações foram formuladas com 30% de proteína digestível e 3.000 kcal de energia digestível. Para a fabricação das rações os alimentos foram moídos em peneira de 1 mm (Tabela 1), posteriormente, foram umedecidas, peletizadas em uma peletizadora elétrica experimental, e estes peletes secos em estufa de ventilação forçada por 24h a 56°C. Quando secos, foram quebrados e assim, adequado o tamanho do pélete à boca dos alevinos.

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

**Tabela 1.** Composição das rações experimentais

Ingredientes <sup>1</sup>	g Kg ração <sup>-1</sup>	
	Tratamento 1 e 2	Tratamento 3 e 4
Farelo de soja	71,39	70,79
Milho	13,00	16,70
Óleo de soja	6,10	5,00
Fosfato bicálcico	2,80	2,80
Calcário calcítico	0,20	0,20
<i>Ascophyllum nodosum</i> g Kg ração <sup>-1</sup>	2,00	0,00
Suplemento mineral e vitamínico <sup>2</sup>	4,00	4,00
Sal	0,50	0,50
Butil hidroxi tolueno (BHT)	0,01	0,01
Total	100,00	100,00

<sup>1</sup> De acordo com Rostagno et al. (2000); <sup>2</sup> Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ác. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg. <sup>2</sup> Valor da DL<sub>50</sub> encontrada no primeiro ensaio

## 2.3. *Ascophyllum nodosum*

A FAM se apresenta como um pó muito fino, de coloração creme clara e com um cheiro característico. Foi fornecida uma quantidade de 20 g.kg ração<sup>-1</sup>. Os valores percentuais da FAM utilizada no presente experimento (com base na matéria natural) para umidade, matéria mineral, matéria orgânica, extrato etéreo e proteína bruta foram respectivamente 9,64; 22,34; 77,66; 2,49; 7,70; o valor de energia bruta foi 2.826,99 (kcal.kg<sup>-1</sup>) (MEURER et al., 2010). Os valores bromatológicos da FAM, fornecidos pelo fabricante estão na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição bromatológica da farinha da alga marinha marrom (*Ascophyllum nodosum*) informada pelo fabricante<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> Acadian Seaplants Limited.

#### 2.4. Inoculação de *Aeromonas hydrophila*

A inoculação das *Aeromonas hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo, foi realizada após 30 dias experimentais com fornecimento da farinha de alga marrom *A. nodosum* nas rações. Por meio de um preparado de inóculo bacteriano com diluição em solução salina estéril a concentração de  $10^6$  UFC/ml essa solução foi injetada via intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe experimental, assim como a solução salina pura, foram aplicadas na proporção de 0,5 ml/animal.

## 2.5. Medições e análises

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

Para controle da higidade da água de cultivo, a água dos aquários foi semeada em meio Agar sangue, antes do procedimento de inoculação de *A. hydrophila* nos peixes experimentais. Os peixes de cada unidade experimental também foram pesados e medidos, agrupados em dois tratamentos: fornecimento da ração testemunha (Tratamento 1) e ração contendo de  $20 \text{ g.kg ração}^{-1}$  (Tratamento 2), com dez repetições cada.

A partir da inoculação, os animais foram avaliados quanto a eventuais manifestações de infecção por *A. hydrophila*, diariamente foi feito um acompanhamento da evolução das lesões nos peixes e mortalidade. Ao final do período experimental, depois de anestesiados com benzocaína (100mg/L) e eutanasiados por secção medular, os peixes de cada unidade experimental, foram pesados e medidos para a determinação dos parâmetros de desempenho e carcaça. Dois peixes de cada unidade experimental tiveram o seu rim extraído para a determinação do índice hepato-somático (IHS), ((peso do fígado/ peso corporal)x100) e de um deles, foi feito cultivo bacteriano do rim em meio ágar Triptona de Soja (TSA).

Depois de avaliados todos os parâmetros propostos, calculados os valores de desempenho, sobrevivência, parâmetros de carcaça e IHS, bem como os parâmetros físico-químicos da água, estes foram submetidos à análise de variância,

(One-way ANOVA) e verificando efeito realizou-se o teste Tukey ( $p < 0,05$ ) caso pelo software *Statistica 7.0*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efeito da *Ascophyllum nodosum* antes da inoculação com *A. hydrophila*

##### 3.1.1. Água dos aquários e cultivo bacteriano

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram, respectivamente,  $27,28 \pm 0,06$  °C e  $28,14 \pm 0,12$  °C;  $7,24 \pm 0,04$  e  $7,14 \pm 0,04$ ;  $6,94 \pm 0,11$  e  $6,73 \pm 0,17$  mg/L;  $68,87 \pm 2,75$  e  $63,71 \pm 3,68$   $\mu\text{Sm/cm}$ . Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

##### 3.1.2. Crescimento e características de carcaça

Os valores médios de crescimento e características de carcaça, após 30 dias experimentais dos alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos à ração contendo  $20 \text{ g.kg ração}^{-1}$  de farinha de *A. nodosum*, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores médios de crescimento e características de carcaça dos alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com 20 g.kg ração<sup>-1</sup> de FAM (2) e ração testemunha (1)

Variáveis	Tratamentos		P*
	1	2	
Peso médio inicial (g)	2,69 ± 0,012	2,69 ± 0,01	0,20
Peso médio final (g)	11,03 ± 0,97	11,50 ± 0,75	0,24
Comprimento total (cm)	8,80 ± 0,24	8,91 ± 0,14	0,23
Comprimento padrão (cm)	7,35 ± 0,62	7,36 ± 0,12	0,96
Largura (cm)	1,35 ± 0,06a	1,40 ± 0,04b	0,02
Altura (cm)	2,51 ± 0,11	2,56 ± 0,10	0,34
Ganho de peso (g)	49,01 ± 6,59	52,88 ± 4,51	0,14
Conversão alimentar aparente	1,46 ± 0,15	1,35 ± 0,07	0,06

\*P = P-valor

O peso inicial dos alevinos utilizados no experimento foi estatisticamente semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. As médias de peso final, comprimento total, comprimento padrão, altura, ganho de peso e conversão alimentar aparente não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em função do fornecimento de 20 g.kg ração<sup>-1</sup> de FAM ( $P > 0,05$ ) na ração. A largura apresentou efeito estatístico ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, mostrando-se significativamente maior no Tratamento 2. A sobrevivência foi de 100% em todas as unidades durante este período experimental.

### 3.2. Efeito da *Ascophyllum nodusum* após inoculação com *A. hydrophila*

#### 3.2.1. Água dos aquários e cultivo bacteriano

Os valores médios para a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, matutina e vespertina foram, respectivamente, 27,31 ± 0,09 °C e 28,14 ± 0,12 °C; 7,2 ± 0,05 e 7,14 ± 0,05; 7,14 ± 0,15 e 6,76 ± 0,15 mg/L; 86,81 ± 0,63 e

82,58 ± 4,5 µSm/cm. Não houve variação dos referidos parâmetros entre os tratamentos (P>0,05).

Nenhum dos aquários apresentou crescimento de colônias do gênero *Aeromonas*. Do cultivo bacteriano do rim, em meio TSA, a partir dos peixes mortos durante o período experimental, houve crescimento de colônias bacterianas do gênero *Aeromonas*, entretanto, o mesmo não foi verificado para o cultivo a partir do rim dos alevinos na finalização do experimento.

### 3.2.2. Sobrevivência, crescimento e conversão alimentar

Os valores médios do peso inicial, peso final, ganho de peso, conversão alimentar aparente e o percentual de sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo, submetidos à ração contendo 20 g.kg ração<sup>-1</sup> de FAM na ração e inoculação de *A. hydrophila* encontram-se na Tabela 4. O peso inicial dos alevinos utilizados no experimento foi estatisticamente semelhante (P>0,05) entre os tratamentos. Da mesma forma, as médias de peso final, ganho de peso, conversão alimentar aparente e o percentual de sobrevivência dos alevinos, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05) em função da FAM e inoculação de *A. hydrophila*.

**Tabela 4.** Valores médios dos parâmetros de desempenho, conversão alimentar aparente (CAa) e sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo.

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				P*
	1	2	3	4	
Peso inicial (g)	2,68 ± 0,01	2,69 ± 0,00	2,68 ± 0,01	2,68 ± 0,01	0,27
Peso final (g)	17,38 ± 1,95	18,03 ± 1,24	16,34 ± 1,89	17,86 ± 0,10	0,36
Ganho de peso (g)	14,70 ± 1,94	15,33 ± 1,24	13,66 ± 1,89	15,18 ± 1,00	0,36
CAa	1,59 ± 0,12	1,52 ± 0,25	1,72 ± 0,15	1,69 ± 0,16	0,28
Sobrevivência (%)	96,67 ± 7,45	100,00 ± 0,00	93,33 ± 9,13	90,00 ± 9,13	0,21

\*P = P-valor; <sup>1</sup> (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com solução salina; (2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo FAM e inoculados com solução salina; (4) grupo recebendo ração contendo FAM e inoculados com *A. hydrophila*.

### 3.2.3. Características e rendimento de carcaça

Os resultados finais médios dos parâmetros corporais, rendimento de carcaça e índice hepatossomático (IHS) dos alevinos de tilápia do Nilo, encontram-se respectivamente nas Tabelas 5 e 6. O comprimento total, comprimento padrão, largura, altura, rendimento de carcaça com e sem cabeça e, os valores do IHS dos alevinos de tilápias do Nilo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) em função da FAM e inoculação de *A. hydrophila*.

**Tabela 5.** Valores finais médios dos parâmetros corporais das tilápias do Nilo submetidos a uma rações contendo farinha de alga marrom *Ascophyllum nodosum* pós inoculação de *A. hydrophila*

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				P*
	1	2	3	4	
Comprimento total (cm)	10,17 ± 0,34	10,23 ± 0,22	9,97 ± 0,38	10,33 ± 0,21	0,31
Comprimento padrão (cm)	8,26 ± 0,22	8,33 ± 0,21	8,08 ± 0,34	8,40 ± 0,18	0,24
Largura (cm)	1,48 ± 0,05	1,51 ± 0,05	1,49 ± 0,06	1,55 ± 0,03	0,17
Altura (cm)	2,83 ± 0,12	2,93 ± 0,08	2,86 ± 0,12	2,91 ± 0,09	0,41

\*P = P-valor; <sup>1</sup> (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com solução salina; (2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo FAM e inoculados com solução salina; (4) grupo recebendo ração contendo FAM e inoculados com *A. hydrophila*.

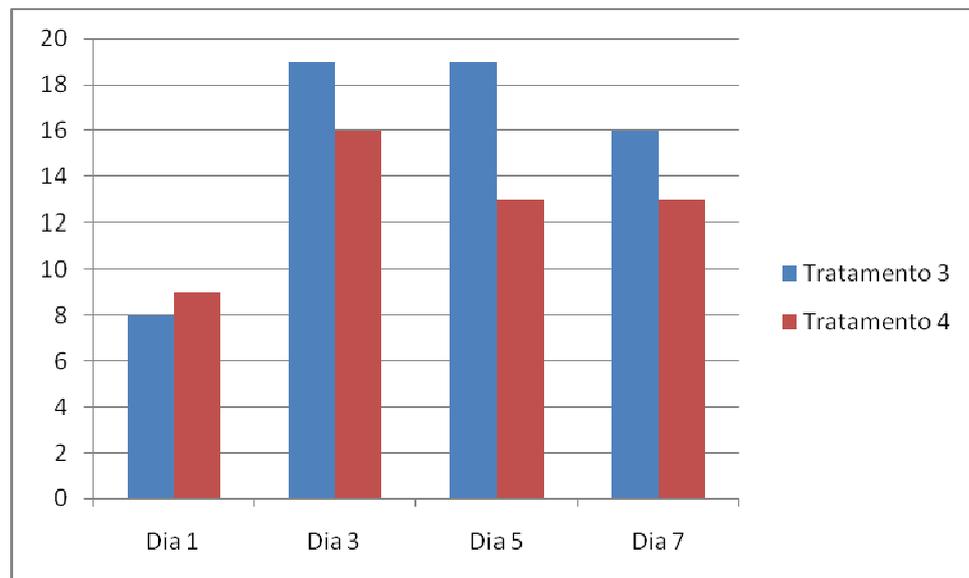
**Tabela 6.** Valores finais do rendimento de carcaça e índice hepatossomático dos alevinos de tilápias do Nilo submetidos a uma rações contendo farinha de alga marrom *Ascophyllum nodosum* pós inoculação de *A. hydrophila*

Variáveis	Tratamentos <sup>4</sup>				P*
	1	2	3	4	
RCc <sup>1</sup> (g)	15,24 ± 1,68	15,74 ± 0,99	13,98 ± 1,44	15,77 ± 0,89	0,14
RC <sup>2</sup> (g)	10,85 ± 1,31	11,28 ± 0,76	10,15 ± 1,09	11,10 ± 0,65	0,32
IHS <sup>3</sup>	2,43 ± 0,52	2,21 ± 0,47	2,04 ± 0,49	2,23 ± 0,24	0,61

<sup>1</sup>Rendimento de carcaça com cabeça; <sup>2</sup>Rendimento de carcaça sem cabeça; <sup>3</sup>Híndice hepatossomático.; \*P = P-valor; <sup>4</sup> (1) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com solução salina; (2) grupo recebendo ração testemunha e inoculados com *A. hydrophila*; (3) grupo recebendo ração contendo FAM e inoculados com solução salina; (4) grupo recebendo ração contendo FAM e inoculados com *A. hydrophila*.

### 3.2.4. Evolução das lesões causadas por *Aeromonas hydrophila*

A análise da ocorrência de lesões nos animais inoculados com *A. hydrophila*, alimentados ou não com FAM, demonstrou que, a partir do terceiro dia, o número de lesões nos animais experimentais foram menores no grupo alimentados com FAM. Estes, também apresentaram uma regressão no número de lesões em um período de tempo menor do que o do grupo controle Figura 1.



**Figura 1.** Evolução no número das lesões causadas por *A. hydrophila* nos alevinos de tilápia do Nilo alimentados (T4) ou não (T3) com farinha de *A. nodusum*.

## 4. DISCUSSÃO

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

No presente estudo, não foi observado mortalidade nos peixes associada a inoculação de *A. hydrophila*. Isto ocorreu provavelmente devido a dose de inoculação  $10^6$  UFC/ml que pode ser considerada baixa, dado o grande potencial

das *A. hydrophila* para os peixes (BOIJINK & BANDÃO, 2001; RODRIGEZ et al., 2008). Na literatura, existem grandes discrepâncias entre os valores das doses letais descritas para isolados de *Aeromonas* spp., sendo que estas variam de  $10^4$  até  $10^{12}$  UFC/ml (BOIJINK & BRANDÃO 2001; BOIJINK et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2011). No presente estudo, a dose de inoculação foi de grande importância, a fim de que fossem observados os efeitos da farinha de alga marrom *Ascophyllum nodosum*, sobre os parâmetros de desempenho da tilápia do Nilo, o que não seria possível com a morte dos animais. Os efeitos de proteção contra mortalidade induzida por *A. salmonicida* em salmões alimentados com extratos de macroalgas foram descritos por Nordmo et al. (1995).

Após análise dos parâmetros de desempenho e carcaça, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, independente do uso ou não de FAM na ração dos animais. Este fato contradiz o descrito por Meurer et al., (2010) que observaram melhoria na conversão alimentar e rendimento de carcaça. Contudo, esses autores trabalharam com peixes mais jovens, bem como em condições híidas de cultivo. Nenhuma diferença estatística nos parâmetros de desempenho também foi relatada em ovinos alimentados do *A. nodosum*, embora os autores citem que, quando analisados em conjunto os resultados mostraram benefícios na digestibilidade da dieta (FIKE, 2005). Da mesma forma, ao analisarmos numericamente nossos resultados verificamos também, parâmetros positivos, quando da inclusão de FAM nas dietas dos animais e inoculação de *A. hydrophila*.

Mesmo sem ocasionar mortalidade significativa nos peixes, *A. hydrophila* provocou o desenvolvimento de lesões, contudo estas foram em menor número e apresentaram redução em um período de tempo menor no grupo dos peixes alimentados com FAM. Este fato pode estar associado a uma maior atividade do sistema imunológico dos peixes, o qual reduziu os danos provocados pela bactéria nos tecidos. Vários estudos apontam para o importante papel do *A. nodosum* como imunoestimulante, especialmente para estímulo da atividade. Ao trabalharem com salmão do Atlântico, Gabrielsen & Austreng (1998), não observaram diferença nos parâmetros de peso final e crescimento, entretanto verificaram efeito positivo sobre a atividade de lisozima sérica. Efeitos positivos sobre o sistema imunológico, e resistência ao estresse foram descritos em ovinos por Saker (2004).

Nos sistemas atuais de produção de peixes, os animais estão predispostos ao estresse e a infecções bacterianas. O que, muitas vezes, exige o uso de drogas antimicrobianas, que são associadas a seleção de microrganismos resistentes e à presença de resíduos nos peixes e no ambiente aquático (VERSCHUERE et al., 2000). A resistência aos antimicrobianos é um ponto de grande preocupação a aquicultura (GUARDABASSI et al., 2010). O uso da FAM, pode ser útil como aditivo alimentar em peixes, uma vez que seus efeitos sobre o sistema imunológico, podem ser importantes para resistência ao ataque por patógenos bacterianos e víricos (NORDMO et al., 1995; GABRIELSEN & AUSTRENG, 1998).

## **5. CONCLUSÃO**

Foi possível concluir que, a farinha de alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum*, embora não apresente efeito significativo sobre os parâmetros de desempenho e carcaça, reduz o número de lesões nos peixes em tempo menor quando comparado ao grupo controle.

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Samira Teixeira Leal de Oliveira. Ao Sr° Adelmo da San Bio, pelo fornecimento de alevinos de tilápia do Nilo.

Esse trabalho possui autorização do comitê de ética da Univasf sob o número 27091053 de 06 de outubro de 2010.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDULLAH, A. I.; HART, C. A.; WINSTANLEY, C. Molecular characterization and distribution of virulence-associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 2003, p. 1001-1007.

ALVES FILHO, F. M. *Ascophyllum nodosum* durante a fase inicial da alimentação da tilápia do Nilo. 2010. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2010.

ARCHER, G. S.; FRIEND, T. H.; CALDWELL, D.; AMEISS, K.; KRAWCZEL, P. D. Effect of the seaweed *Ascophyllum nodosum* on lambs during forced walking and transport. *J Anim Sci*, 2008. p. 85:225-232.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; RENOSTO, A. V. Inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em jundiá, *Rhamdia quelen* (teleostei: pimelodidae), *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.3, 2001. p. 497-501.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D.A. Inoculação Bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a Sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.3, 2001. p. 503-507.

BRANDEN, K.W.; BLANTON, J.R.; MONTGOMERY, J.L.; VAN SANTEN, E.; ALLEN, V.G.; MILLER, M.F. Tasco supplementation: Effects on carcass characteristics, sensory attributes, and retail display shelf-life. *J. Anim. Sci.* 85, 2007. p. 754-768.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArte, 2004. p. 533.

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

FAO (2010) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010 (in Spanish)*. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome. p. 242.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *R. Bras. Zootec.*, v.37, 2008. p. 08-14.

FIKE, J.H. ; SAKER, K.E. ; O'KEEFE, S.F.; MARRIOTT, N.G.; WARD, D.L.; FONTENOT, J.P.; VEIT, H.D. Effects of (a seaweed extract) and heat stree on N metabolism and meat fatty acids in wether lambs fed hays containing endophyte-infected fescue. *Small Ruminant Res.* 60, 2005. p. 237-245.

FRERICHS, G.N.; MILLAR, S.D. Manual for the isolatios and identification of fish bacterial pathogens. Stirling: Pisces Press, 1993. p. 60.

GABRIELSEN, B.O.; AUSTRENG, E. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed wet feed with alginate. *Aquac. Res.* 29, 1998. p. 397-401.

GARDINER, G.E.; CAMPBELL, A.J.; O'DOHERTY, J.V.; PIERCE, E.; LYNCH; P.B.; LEONARD, F.C.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; LAWLOR, P.G. Effect of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance, digestibility, carcass characteristics and selected intestinal microflora populations of grower–finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 2008. p. 259-273.

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

KANNAN, G.; TERRILL, T.H.; KOUAKOU, B.; GALIPALLI, S. Blood metabolite changes and live weight loss following brown seaweed extract supplementation in goats subjected to stress. *Small Ruminant Research*, 73, 2007a. p. 228-234.

KANNANA, G.; SAKER, K.E.; TERRILL, T.H.; KOUAKOU, B.; GALIPALLI, S.; GELAYE, S. Effect of seaweed extract supplementation in goats exposed to simulated preslaughter stress. *Small Ruminant Research*, 73, 2007b. p. 221-227.

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

MEURER, F.; COSTA, M.M.; COLPINI, L.M.S; OLIVEIRA, S.T.L.; PAIXÃO, P.S. Brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (Le Jolis 1863) meal to Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*. 2010.

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

NAKAGAWA, H.; UMINO, T.; TASAKA, Y. Usefulness of *Ascophyllum* meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 151, 1997. p. 275-281.

NORDMO, R.; HOLTH, J. M.; GABRIELSEN, B. O. Immunostimulating effect of alginate feed with *Aeromonas salmonicida*. *Molecular biology and biotechnology*, 1995. p. 232-235.

OLIVEIRA, S. R.; SOUZA, R. T. Y. B.; BRASIL, E. M.; ANDRADE, J. I. A.; NUNES, É. S. S.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta amazônica*, vol. 41(2), 2011. p. 321-326.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, 2008. p. 311.

ROBERTS, R. J. Patologia de los peces. Edição espanhola: Cachafeiro, M. C. B. 1 ed. Madrid, 1981. p. 365.

RODRIGUEZ, I.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* . 2008. p. 25:239–249.

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

SAKER, K.E.; FIKE, J.H.; VEIT, H.; WARD, D.L. Brown seaweed- (Tasco™) treated conserved forage enhances antioxidant status and immune function in heat-stressed wether lambs. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 88, 2004. p. 122-130.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64., v.4, p.655-671, 2000.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As *Aeromonas hydrophila* são potencialmente virulentas para organismos aquáticos. Dentre os genes de virulência presentes nessas bactérias, o mais frequente é o gene da Aerolisina.

As aflatoxinas em níveis de até 1,177 g.kg ração<sup>-1</sup> não apresentam influência sobre o desempenho e rendimento de carcaça de alevinos de tilápia do Nilo. Mas são influenciados quando inoculados com *A. hydrophila*. Estudos com doses superiores devem ser realizados.

A alga marrom *Ascophyllum nodosum* numericamente proporcionou melhorias no desempenho dos peixes e, foi eficaz no controle de lesões ulcerativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMI, L.; FIVAZ, M.; DECROLY, E.; SEIDAH, N. G.; JEANI, F.; THOMASI, G.; LEPPLA, S. H.; BUCKLEY, J. T.; VAN DER GOOT, F. G. The pore-forming toxin proaerolysin Is activated by furin, *The journal of biological chemistry*, vol. 273, n. 49, 1998.
- ALBUQUERQUE, I. R. L. Purificação e caracterização parcial de uma Fucana C de *Dictyota menstrualis* e estudo do seu efeito antiinflamatório e nociceptivo. 81p. Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- ALVES FILHO, F. M. *Ascophyllum nodosum* durante a fase inicial da alimentação da tilápia do Nilo. 2010. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2010.
- ARCHER, G. S.; FRIEND, T. H.; CALDWELL, D.; AMEISS, K.; KRAWCZEL, P. D. Effect of the seaweed *Ascophyllum nodosum* on lambs during forced walking and transport. *J Anim Sci*, 2007. p. 85:225-232.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. Fish pathogens diseases in farmed and wild. Chichester, UK : Ellis Horwood., 1987. p. 196-224.
- BENEVIDES et al. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten Brazilian marine algae. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 10, p. 31, 1998.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, Vol. 16, n. 3, 2003. p. 497-516.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13(6), 29-40, 2003.
- BIRD, G. M.; HAAS, P. Nature of the cell wall constituents of *Laminaria* spp. *Biochem. J.*, v. 25, p. 403, 1931.
- BISCARDI, D.; CASTALDO, A.; GUALILLO, O.; DE FUSCO, R., 2002. The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *The Science of the Total Environment* 292, 255–263.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. AQUICULTURA – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128p.

BRANDEN, K.W.; BLANTON, J.R.; MONTGOMERY, J.L.; VAN SANTEN, E.; ALLEN, V.G.; MILLER, M.F. Tasco supplementation: Effects on carcass characteristics, sensory attributes, and retail display shelf-life. *J. Anim. Sci.* 85, 2007. p. 754-768.

BRASIL - MPA - Ministério da Pesca e Aqüicultura. Produção Pesqueira e Aquícola – Estatística 2008 e 2009. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso: 19/04/2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria MA/SNAD/ SFA nº 07, de 09/11/88. *Diário Oficial da União*, Brasília, 9 nov. 1988. Seção I, p.21968.

CANALS, R.; ALTARRIBA, M.; VILCHES, S.; HORSBURGH, G.; SHAW, J.G.; TOMÁS, J.M.; MERINO, S. Analyses of lateral flagella gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J Bacteriol*, 188, 2006, p. 852–862.

CHAKRABORTY, T.; MONTENEGRO, M. A.; SANYAL, S. C.; HELMUTH, R.; BULLING, E.; TIMMIS, K. N. Cloning of Enterotoxin Gene from *Aeromonas hydrophila* Provides Conclusive Evidence of Production of a Cytotoxic Enterotoxin. *Infection and immunity*, vol. 46, n. 2 1984. p. 435-441.

COSTA, A.B. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, SP: USP, 2003. p. 54 Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, 2003.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p.23–36.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArte, 533p. 2004.

DOOLEY, J. S. G.; TRUST, T. J. Surface Protein Composition of *Aeromonas hydrophila* Strains Virulent for Fish: Identification of a Surface Array Protein. *Journal of bacteriology*, Vol. 170, n. 2, 1988, p. 499-506.

FAO (2010) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010 (in Spanish)*. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome. p. 242.

FIKE, J.H. ; SAKER, K.E. ; O'KEEFE, S.F.; MARRIOTT, N.G.; WARD, D.L.; FONTENOT, J.P.; VEIT, H.D. Effects of (a seaweed extract) and heat stress on N metabolism and meat fatty acids in wether lambs fed hays containing endophyte-infected fescue. *Small Ruminant Res.* 60, 2005. p. 237-245.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Tech.* 10, 25-28, 1999.

FRERICHS, G.N. Bacterial diseases Of marine fish. *Veterinary Record.* V.125, p.315-318, 1989.

GARDINER, G.E.; CAMPBELL, A.J.; O'DOHERTY, J.V.; PIERCE, E.; LYNCH, P.B.; LEONARD, F.C.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; LAWLOR, P.G. Effect of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance, digestibility, carcass characteristics and selected intestinal microflora populations of grower–finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 2008. p. 259-273.

GAVÍN, R.; RABAAAN, A. A.; MERINO, S.; TOMÁS, J. M.; GRYLLOS, I.; SHAW, J. G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 43, 383-397.

HOWARD, S. P.; BUCKLEY, J. T. Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochemistry*, 1982. p. 21:1662-1667.

HOWARD, S. P.; BUCKLEY, J. T. Protein export by a gram-negative bacterium: production of aerolysin by *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 1985. p. 161:1118-1124.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. Estatística da Pesca 2005 Brasil – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília: IBAMA, 2007. 108p.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 23, p. 35–73, 2010.

JORY, D.E.; ALCESTE, C.; CABRERA, T.R. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. *Panorama Acuicola*. v.5, n.5, p. 50-53, 2000.

KANNAN, G.; TERRILL, T.H.; KOUAKOU, B.; GALIPALLI, S. Blood metabolite changes and live weight loss following brown seaweed extract supplementation in goats subjected to stress. *Small Ruminant Research*, 73, 2007a. p. 228-234.

KANNANA, G.; SAKER, K.E.; TERRILL, T.H.; KOUAKOU, B.; GALIPALLI, S.; GELAYE, S. Effect of seaweed extract supplementation in goats exposed to simulated pre-slaughter stress. *Small Ruminant Research*, 73, 2007b. p. 221-227.

KHAJANCHI, B. K.; FADL, A. A.; BORCHARDT, M. A.; BERG, R. L.; HORNEMAN A. J.; Stemper, M. E.; Joseph, S. W.; Moyer, N. P.; Sha, J.; Chopra, A. K. Distribution of Virulence Factors and Molecular Fingerprinting of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, n. 7, 2010, p. 2313–2325.

KINGOMBE, C.I.B.; HUYS, G.; HOWALD, D.; LUTHI, E.; SWING, J.; JEMMI, T. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. Harboring virulence markers in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94, 2004. p. 113–121.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 4. ed. Jundiá, SP, 2004. p. 118.

KÜHN, I. *et al.* Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63, n.7, p.2708-2715, 1997.

LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; THA. THAYUMANAVAN; SUBASHKUMAR, R. *Marine Microbiology: Facets & Opportunities*. Editado por Ramaiah, N. National Institute of Oceanography Dona Paula, Goa. 259 p. 2005.

LARSEN, B.; HAUG, A. ; PAINTER, T. Sulphated polysaccharides in brown algae. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Acta Chem. Scand.*, v. 24, p. 3339-3352, 1970.

LEUNG, K. Y.; STEVENSON, R. M. W.. Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.* 1988. p.56:2639–2644.

LOPES, P. R. S.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.40, n.10, 2005. p. 1029-1034.

MERINO, S., X. RUBIRES, A. AGUILLAR, J. F. GUILLOT, AND J. M. TOMAS. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization *in vivo* of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb. Pathog.* 1996, 20:325–333.

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

MEURER, F.; COSTA, M.M.; COLPINI, L.M.S; OLIVEIRA, S.T.L.; PAIXÃO, P.S. Brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (Le Jolis 1863) meal to Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*. 2010.

NAKAGAWA, H.; UMINO, T.; TASAKA, Y. Usefulness of *Ascophyllum* meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 151, 1997. p. 275-281.

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, v.45, n.4, 2007. p. 297-304.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestic animals. Washington, D.C., 1993. p. 114.

OTTAVIANI, D.; PARLANI, C.; CITTERIO, B.; MASINI, L.; LEONI, F.; CANONICO, C.; SABATINI, L.; BRUSCOLINI, F.; PIANETTI, A. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 2011. p. 538–545 .

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Maringá: Eduem, 2008. p. 311.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. 1997. p. 152:1–10.

ROBERTS, R. J. Patologia de los peces. Edição espanhola: Cachafeiro, M. C. B. 1ª ed. Madrid, 365p. 1981.

RORRER, G. L.; CHENEY, D. P. Bioprocess engineering of cell and tissues cultures for marine seaweeds. Acquacultural engineering, v. 32, p. 11-41, 2004.

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. Arquivos do Instituto de Biologia, v.68, 2001. p.107-114.

ROSSI JR, O.D.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A. Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Belo Horizonte, vol. 52, n.5, 2000.

SAKER, K.E.; FIKE, J.H.; VEIT, H.; WARD, D.L. Brown seaweed- (Tasco™) treated conserved forage enhances antioxidant status and immune function in heat-stressed wether lambs. J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr. 88, 2004. p. 122-130.

SANTOS, F. G. B. Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com potencial patogênico em pacamã (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877). Pertolina, PE; UNIVASF. 2011, p. 67. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2011.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. Journal of Applied Microbiology. v.97, p.1077-1086, 2004.

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

SHARP, G.J. *Ascophyllum nodosum* and its harvesting in Eastern Canada. In: Case studies of seven commercial seaweed resources. FAO Technical Report. 281,3-46, 1986.

SILVA, L. J. *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: Fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais pesados. Pertolina, PE; UNIVASF. 2011, p. 60. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2011.

VIZZOTTO, B. S.; Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009. Curitiba, 2009, 101 p. (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde) Universidade Federal do Paraná, 2009.

WALTERS, G.R., PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J Fish Biol. v.17, p.177-185, 1980.

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K. et al. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. Reviews in Fisheries Science, v.10, n.3, p.465–498, 2002.

YU, H. B.1 Zhang, Y. L.; Lau, Y. L.; Yao, F.; Vilches, S.; Merino, S.; Tomas, J. M.; Howard, S. P.; Leung, K. Y. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. Applied and Environmental Microbiology v.71, n.8, p.4469–4477, 2005.

YU, H. B.; SRINIVASA RAO, P. S.; LEE, H. C.; VILCHES, S.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; LEUNG, K. Y. A TYPE III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. Infect. Immun, 2004, 72:1248–1256.

ZHANG, H. B.; WANG, L. H. ; ZHANG, L. H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. p. 99:4638–4643.