

Scheila Anelise Pereira

**SELEÇÃO E USO DE PROBIÓTICO AUTÓCTONE EM
DIETA PARA GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Florianópolis
2015

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

Pereira, Scheila Anelise
SELEÇÃO E USO DE PROBIÓTICO AUTÓCTONE EM DIETA PARA
GIRINOS DE RÃ-TOURO / Scheila Anelise Pereira ;
orientador, José Luiz Pedreira Mouriño - Florianópolis, SC,
2015.
91 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Ranicultura. 3. Bactéria ácido-
lática. 4. Antagonismo. 5. Velocidade de crescimento. I.
Pedreira Mouriño, José Luiz. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
III. Título.

Integração de plantas com espécies nativas de peixes em sistema de aquaponia

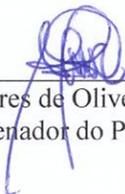
Por

ARTUR DE FREITAS ARAUJO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

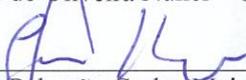


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Orientador*



Dr. Giuliano Palemão Carlos Maia Huergo



Dr. Jorge Luiz Barcelos Oliveira



Dr. Maurício Gustavo Coelho Emerenciano

*Dedico à minha amada mãe, Vera Lucia
Pereira, a eterna e incondicional
incentivadora dos meus sonhos, pelo apoio,
encorajamento, carinho, amor e pelos infinitos
ensinamentos.*

AGRADECIMENTO

À Deus por sempre iluminar minhas escolhas e meu caminho.

À minha querida mãe, Vera Lucia Pereira, uma mulher batalhadora, que sempre me ensinou a nunca desistir, mostrou-me que os empecilhos aparecem em nossa caminhada, mas não devemos fraquejar, me apoiou, incentivou e ajudou ao longo deste trabalho.

Aos meus irmãos pelo carinho e apoio.

Ao meu namorado Diego Dutra, por toda a compreensão, amor, carinho, ajuda na execução do experimento e todos os momentos bons e alegres que passamos.

Ao meu orientador e amigo Prof. José Luiz P. Mouriño, pelos ensinamentos, confiança, conselho, ajuda e momentos descontraídos que fizeram toda a diferença ao longo desses 4 anos de parceria.

Aos professores e amigos que admiro muito Prof. Felipe do Nascimento Vieira e Prof. Mauricio Laterça Martins, pelos ensinamentos diretos ou indiretos, brincadeira e puxões de orelha ao longo desses anos na aquicultura.

Aos amigos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) e do setor de microbiologia, Ariane Martins, Bruno Correa, Camila, Carlos Miranda, Carlos biólogo, Cristiane, David, Delano, Dimas, Esmeralda, Fernanda, Gabriel, Gabriela S., Gabriella P., Hortência, Hugo, Isabela, Jessica, Josy, Juliana, Karine, Lincon, Natalia, Marcela, Marco, Maria, Marizinha, Marysol, Norha, Priscila, Rafael biólogo, Seu Xico, Tamires e Zé vitor, pelos inúmeros momentos de risadas no café, ajuda nos momentos difíceis, cada um contribuiu da sua maneira para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos amigos do laboratório AQUOS sanidade de organismos aquáticos: Aline, Ana Lúcia, Eduardo, Gabriela e outra menina, Gabriela H., Jorge, Karen, Lilian, Lucas, Maitê, Michele, Monyelle e Paula, por toda ajuda na coleta, nos momentos descontraídos, saibam que cada um contribuiu da sua maneira no andamento deste trabalho.

As minhas amigas e conselheiras de escrita e da vida Natália da Costa Marchiori e Gabriela Tomas Jerônimo, por todos os momentos de reflexões, palavra amiga, incentivo e ensinamentos pessoal e profissional.

À minha amiga de graduação e confidente Eliziane Silva, pelo carinho, atenção e ajuda em diversos momentos da minha trajetória acadêmica e pessoal.

À Patrícia Garcia, por toda a paciência de me ensinar as técnicas histológicas, que descobri ser uma técnica linda.

Ao Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) e principalmente aos Profs. Zenilda Laurita Bouzon e Éder Carlos Schimdt, pela parceria e por todo o suporte, estrutura e apoio para realização das análises de microscopia.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) por todo o suporte e apoio dos técnicos para realização das análises de microscopia eletrônica.

Ao laboratório AQUOS pela estrutura e apoio para realização do experimento.

Ao LCM por ter sido minha casa durante a execução do experimento e pela estrutura.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Meus sinceros agradecimentos a todos, os mencionados e os esquecidos.

RESUMO

A suplementação dietética de probióticos autóctones na produção animal vem se consolidando como medida alternativa ao uso de antibióticos, os quais podem ocasionar problemas econômicos, sanitários e ambientais quando utilizados de forma indevida. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar uma bactéria autóctone com potencial probiótico para rã-touro *Lithobates catesbeianus* e posteriormente suplementar este micro-organismo em dietas para girinos desta espécie. Inicialmente, foram isoladas 20 cepas de bactérias autóctones. Entretanto, apenas nove cepas foram selecionadas e submetidas aos testes *in vitro*. Ao final dos testes, constatou-se que a cepa de *L. plantarum* apresentou maior potencial probiótico dentre as avaliadas. Dessa forma, realizou-se a suplementação dietética deste micro-organismo em dietas comercial para girinos. O ensaio experimental foi composto por dois tratamentos: grupo sem suplementação e grupo suplementado com *L. plantarum*. Os animais que receberam dieta suplementada apresentaram maior ganho de peso, maior concentração de bactéria ácido-lática no intestino e menor conversão alimentar. A cepa *L. plantarum* foi capaz de produzir diversas enzimas digestivas, colonizar a ração e o trato intestinal dos girinos, mantendo-se em alta concentração 10^7 e 10^6 UFC·g⁻¹, respectivamente. A cepa *L. plantarum* exibiu potencial probiótico para girinos de rã-touro.

Palavras chaves: Aquicultura. Ranicultura. Bactéria ácido-lática. Antagonismo. Velocidade de crescimento.

ABSTRACT

Dietary supplementation indigenous probiotics in animal production is being consolidated as an alternative measure to antibiotics, which can lead to economic, health and environmental problems when used improperly. Given this, the aim of this study was to isolate and select an indigenous bacteria with probiotic potential for bull frog *Lithobates catesbeianus* and then supplement this microorganism in diets for tadpoles of this species. Initially, they isolated 20 strains of indigenous bacteria. However, only nine strains were selected and subjected to *in vitro*. At the end of the tests, it was concluded that the strain of *L. plantarum* showed greater potential probiotic among the evaluated. Thus, there was a dietary supplementation of this microorganism in commercial diets for tadpoles. The experiment was composed of two treatments: without supplementation group and group supplemented with *L. plantarum*. Animals fed supplemented diet showed higher weight gain, higher concentration of lactic acid bacteria in the intestine and lower feed conversion. *L. plantarum* strain was able to produce various digestive enzymes, food and colonize the intestinal tract of tadpoles, keeping in high concentrations 10^7 e 10^6 UFC·g⁻¹ respectively. The strain *L. plantarum* has the potential probiotic for tadpoles of bullfrogs.

Keyword: Aquaculture. Frog culture. Lactic acid bacteria. Antagonism. Growth rate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Desempenho zootécnico de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) alimentada com ração comercial suplementada com *L. plantarum* ou com ração não suplementada. **a)** Ganho de peso médio final. **b)** Conversão alimentar média. **c)** Porcentagem de sobrevivência. (*) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) 65
- Figura 2** Concentração de bactérias no intestino de girinos alimentados com ração comercial suplementada com probiótico *L. plantarum* (Shaw, 1802) ou com ração não suplementada. **a)** Contagem de bactérias ácido-láticas no trato intestinal. **b)** Contagem de bactérias heterotróficas totais no trato intestinal. (*) Indica diferenças significativas ($p < 0,05$) 66
- Figura 3** Corte histológico do intestino de girinos de *Lithobates catesbeianus* no estágio G3. **a)** grupos não suplementado (corado com HE), membrana serosa (asterisco), leucócito granular (LG-PAS) (círculo), submucosa (SM), tecido epitelial pseudoestratificado (EpCp), microvilosidades (seta contínua) e células caliciformes (pontas de setas). **b)** grupo suplementado com *L. plantarum* (corado com Tricrômio de Masson), início da formação dos vilos (setas contínuas) e tecido conjuntivo frouxo (cabeças de setas) 67
- Figura 4** Corte histológico do intestino de girinos de *Lithobates catesbeianus* no estágio G3 dos grupos não suplementado e suplementado com *L. plantarum*, corados com HE. **a, b e c** representam o grupo não suplementado, onde em **a)** leucócito granular (LG-PAS) (asterisco); **b)** centro de melanomacrófago (asterisco) e tecido conjuntivo frouxo (seta) e **c)** pontos de melanização (asteriscos); **d)** representa o grupo suplementado, centro de melanomacrófago (seta contínua), pontos de melanização (asteriscos) e tecido conjuntivo frouxo (cabeças de setas) 68
- Figura 5** Corte histológico do intestino de girinos de *Lithobates catesbeianus* no estágio G3 dos grupos não suplementado e suplementado com *L. plantarum* respectivamente **a e b**, corados com Tricrômio de Masson. **a)** células caliciformes (asteriscos); **b)** células caliciformes (asteriscos) e leucócito granular LG-PAS (círculo) 69
- Figura 6** Corte histológico do intestino de girinos de *Lithobates catesbeianus* no estágio G3 dos grupos não suplementado e suplementado com *L. plantarum* respectivamente **a e b**, corados com Perl. **a)** ferro férrico sendo absorvido pelas células epiteliais (cabeça de seta) e o acúmulo de hemossiderina dentro dos melanomacrófagos

(asteriscos); **b**) ferro férrico sendo absorvido pelas células epiteliais (cabeça de seta) e o acúmulo de hemossiderina dentro dos melanomacrófagos (asteriscos)69

LISTA DE TABELA CAPÍTULO 2

Tabela 1: Antagonismos das cepas bacterianas selecionadas do trato intestinal de rã-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> adulta e assintomática contra as <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Escherichia coli</i> *	42
Tabela 2: Título da mínima concentração inibitória (MIC) dos produtos extracelulares das cepas bacterianas selecionadas do trato intestinal de rã-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> adulta e assintomática em Log_2 contra duas variedades de bactérias patogênicas: <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (ATCC 7966) e <i>A. hydrophila</i> (CPQBA 228-08 DRM).....	43
Tabela 3: Tolerância a sais biliares (5%), porcentagem de redução do pH, produção de protease e sensibilidade à tetraciclina (TET) das cepas bacterianas selecionada do trato intestinal de rã-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> adulta e assintomática	44
Tabela 4: Velocidade máxima de crescimento bacteriano das cepas selecionadas do trato intestinal de rãs-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> adultas e assintomáticas, tempo de duplicação e contagem total após 24h de crescimento bacteriano*	45
Tabela 5: Classificação das cepas selecionadas do trato intestinal de rãs-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> adultas e assintomáticas segundo a distância ao ideótipo criado pelo teste de Mahalanobis ao nível de significância de 5%	45

LISTA DE TABELA CAPÍTULO 3

Tabela 1: Dados bromatológicos das rações comercial suplementada com <i>L. plantarum</i> e a ração do grupo não suplementado*	85
Tabela 2: Alterações histológicas (%·trato intestinal ⁻¹) da porção anterior do trato intestinal de girinos no estágio G3 não suplementados e suplementados com <i>L. plantarum</i>	93

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	19
Introdução Geral	19
Sanidade e perspectivas para ranicultura	19
1. Importância da ranicultura e breve histórico no Brasil	19
2. Principais entraves na produção de rãs	20
3. Principais enfermidades na ranicultura	21
4. Manejo preventivo à enfermidade	25
5. Probióticos com ênfase no desempenho zootécnico de rãs	28
JUSTIFICATIVA	30
OBJETIVOS	31
HIPÓTESE	32
FORMATAÇÃO	32
CAPÍTULO 2	33
Isolamento e seleção de bactérias autóctones com potencial probiótico do trato intestinal de rã-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw 1802)	33
Abstrat	33
Resumo	34
Introdução	35
Materiais e Métodos	36
1. Aquisição dos animais.....	36
2. Isolamento e seleção de bactérias autóctones potencialmente probióticas.....	36
3. Atividade da catalase.....	37
4. Inibição de patógenos <i>in vitro</i>	37
5. Definição da concentração da bactéria patogênica para o título da mínima concentração inibitória dos produtos extracelulares.....	38
6. Tolerância aos sais biliares, redução do pH, produção de protease e sensibilidade à tetraciclina.....	38
7. Cinética de crescimento e viabilidade celular.....	39
8. Caracterização bioquímica.....	40
9. Análise estatística.....	40
Resultados	41
1. Isolamento e seleção de bactérias potencialmente probióticas.....	41
2. Atividade de catalase.....	41
3. Inibição de patógenos <i>in vitro</i>	41
4. Definição da concentração da bactéria patogênica para o título da mínima concentração inibitória dos produtos extracelulares.....	42
5. Tolerância aos sais biliares, porcentagem de redução do pH, produção de protease e sensibilidade à Tetraciclina.....	43
6. Cinética de Crescimento e Viabilidade celular.....	44
7. Teste de Mahalanobis (D2) e Caracterização bioquímica.....	44
Discussão	46

Agradecimentos	50
Referências	50
CAPÍTULO 3	57
Potencial probiótico de <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctone na dieta de girinos de rã-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw 1802) ...	57
Abstract	57
Resumo	58
Introdução	59
Materiais e Métodos	60
1. Material biológico e teste de produção enzimática	60
2. Preparo das dietas experimentais e análise bromatológica	61
3. Contagem microbiológica da ração	61
4. Delineamento experimental	61
5. Índices zootécnicos	62
A. Sobrevivência (S).....	62
B. Ganho de peso total (G.P.T)	62
C. Conversão alimentar (C.A)	62
6. Contagem microbiológica do trato gastrointestinal	63
7. Análise histológica.....	63
8. Análise estatística	63
Resultados	64
1. Teste de produção enzimática	64
2. Análise bromatológica da ração.....	64
3. Contagem microbiológica da ração	64
4. Parâmetros de qualidade de água.....	64
5. Índices Zootécnicos	65
6. Contagem microbiológica do trato gastrointestinal	65
7. Análise histológica.....	66
Discussão	70
Conclusão	73
Agradecimentos	73
Referências	73
CONCLUSÃO GERAL	80
CONSIDERAÇÃO FINAL	80
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	81
ANEXO I ANEXO II	88
ANEXO II	88
ANEXO II	90
ANEXO II	91

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Sanidade e perspectivas para ranicultura

1. Importância da ranicultura e breve histórico no Brasil

A criação de rãs em cativeiro, denominada ranicultura, baseada na exploração de rã-touro *Lithobates catesbeianus* Shaw (1802), é uma alternativa de empreendimento agroindustrial que se desenvolveu nas últimas décadas devido ao avanço tecnológico e ao aperfeiçoamento das instalações e técnicas de manejo utilizadas no cultivo. Uma de suas principais vantagens é a necessidade de pouco espaço em relação às demais atividades pecuárias intensivas (CRIBB et al. 2013; MOREIRA et al. 2013).

O mercado mundial exige cada vez mais alimento de qualidade, e a carne de rã é um deles. Este produto, considerado nobre, possui boa aceitabilidade e cunho medicinal, indicado por nutricionistas e médicos por apresentar boa digestibilidade, ser hipoalergênica, possuir baixo teor de gordura e colesterol, elevado nível de proteína, e ainda possui todos os aminoácidos essenciais para o ser humano (PIRES et al. 2006; NÓBREGA et al. 2007; AFONSO 2012). Além disso, de acordo com Baggio Silva et al. 2009, o mercado não se limita apenas ao consumo da carne de rã, pois novos subprodutos derivados da rã estão sendo desenvolvidos e ganhando cada vez mais mercado.

Devido à demanda da carne de rã, a produção mundial em 2013 de *L. catesbeianus* alcançou cerca de 4,2 mil toneladas, movimentando 12,5 milhões de dólares, enquanto que no Brasil foram produzidas 600 toneladas, com rendimento de 3 milhões de dólares neste período (FAO, 2015).

Originária do Norte dos Estados Unidos da América e Sudeste do Canadá, a rã-touro foi introduzida no Brasil por Tom Cyriril Harrison na década de 30, quando trouxe 300 casais para baixada Fluminense no Rio de Janeiro, onde a espécie se adaptou muito bem às condições climáticas brasileiras, favorecendo seu desenvolvimento e reprodução. Já a prática da ranicultura, iniciou em 1935 com a instalação do Ranário Aurora (FERREIRA et al. 2002; FEIX et al. 2006).

Desde o início da atividade no Brasil, vários modelos de cultivo foram delineados para engorda destes animais. O modelo denominado tanque ilha, apresentou como característica principal a escavação na

terra de um tanque com uma ilha central onde eram depositados produtos orgânicos como atrativos para insetos que serviam de alimentos para as rãs. Este sistema é pouco recomendado do ponto de vista higiênico-sanitário, além de apresentar resultados pouco efetivos no desenvolvimento dos animais (FONTANELLO et al. 1993). O sistema denominado confinamento, proposto por Oliveira (1983), caracterizou-se por baias menores de alvenaria facilitando a limpeza, apresentando áreas secas e alagadas (piscinas). O sistema Anfigranja, sugerido por Lima & Agostinho (1988) são construções, cujas baias apresentam disposição linear de cocho para alimentação, abrigo para proteção e área alagada para manutenção metabólica. Fontanello et al. (1988) propôs a engorda de rãs em gaiolas, na tentativa de diminuir o canibalismo e aumentar a produtividade por área e, mais tarde a possibilidade de utilização de andares com o surgimento do sistema Ranabox em 1990. Cinco anos após, Mazzoni et al. (1995) recomendaram o sistema inundado, originalmente desenvolvido em Taiwan, onde os animais são mantidos em baias preenchidas totalmente com água e abriga maiores densidades de estocagem, o qual é fortemente utilizado nos dias atuais. Por fim, atualmente observam-se os sistemas híbridos, que envolvem adaptações de dois ou mais sistemas.

2. Principais entraves na produção de rãs

A ranicultura enfrenta o “famoso” ciclo vicioso, na relação oferta/demanda da carne de rã, no qual o preço elevado restringe o mercado, reduzindo a demanda, que por sua vez, inibe a oferta do produto (LIMA, 2005), o que caracteriza o alto custo de produção. Por sua vez, a maioria dos produtores enfrentam frequentes problemas relacionados à mortalidade de rãs decorrentes de falha de manejo sanitário, instalações inadequadas, água de má qualidade e consanguinidade (HIPÓLITO, 2004).

Entretanto, pode-se considerar atualmente que a falta de uma ração específica para rã-touro, é um dos principais obstáculos da ranicultura, onde a alimentação em cativeiro é feita com rações comerciais utilizadas para atender as exigências nutricionais de peixes, pois não se dispõe de informações suficientes para necessidade das rãs-touro, acarretando a ineficiência na conversão alimentar e aumentando o custo de produção. Aliados a isso, há outros fatores inerentes aos desafios da atividade, na tentativa de mitigar os fatores estressantes como o canibalismo, presença de predadores, competição por alimento e espaço, vertentes estas que retardam o crescimento do animal,

consequentemente reduz o sistema imune, tornando o animal mais susceptível a doenças, levando ao insucesso da atividade (FEIX et al. 2006; TEIXEIRA, 2007; SEIXAS-FILHO et al. 2008).

3. Principais enfermidades na ranicultura

Com o incremento na produção da carne de rã, maior atenção tem sido dada aos aspectos sanitários associados a essa atividade, resultando no aumento de informações acerca das enfermidades que podem ocorrer nos animais destinados à produção comercial. Atualmente, é bem aceito que a ocorrência de práticas de gestão pouco adequadas ao sucesso sanitário de um cultivo como, por exemplo, o emprego de sistemas com altas densidades de estocagem, o uso excessivo ou inadequado de ração, bem como as produzidas com matéria prima de baixa qualidade e acompanhadas de mudanças ambientais importantes, podem impactar negativamente a saúde das rãs. Todos os fatores supracitados podem induzir estresse, imunossupressão e alterações hematológicas às mesmas (FENERICK Jr. et al. 2006), tornando-as susceptíveis à surtos epizooticos.

Assim, de maneira simplificada, a transmissão de uma doença infecciosa está baseada não somente na presença de um organismo patógeno, mas também de um hospedeiro susceptível e de um ambiente adequado para tal transmissão (RUTHIG, 2013). Em se tratando de doenças de importância para os cultivos de rã-touro, aquelas causadas por agentes bacterianos oportunistas podem ser consideradas como as mais prejudiciais e também as mais comuns (MOURIÑO et al., 2006).

A doença da perna vermelha (red-leg syndrome) é considerada uma forma epizootica de septicemia bacteriana usualmente acompanhada de ulceração cutânea. É recorrente em cultivos de *L. catsebianus* e uma das grandes responsáveis por significativas perdas econômicas devido à mortalidade (PASTERIS et al., 2011). Os principais agentes associados à manifestação da doença da perna vermelha são *Citrobacter freundii* (PASTERIS et al., 2011), *Aeromonas hydrophila* (MOURIÑO et al., 2006) e *Pseudomonas aeruginosa* (SOUZA-JUNIOR & HIPOLITO, 2001). A doença afeta rãs em diferentes estágios de desenvolvimento, inclusive girinos. Os animais mantidos na fase de engorda e/ou reprodução são os mais afetados pela bacteriose que tem como porta de entrada algum tipo de lesão decorrente de imunossupressão ou problemas com a estrutura de cultivo.

Entre os sinais clínicos, há destaque para postura anormal do corpo, letargia, perda de apetite com consequente perda de peso e

indiferença aos estímulos externos (PASTERIS, 2006). Há presença de hemorragia nas patas e na região ventral do corpo, sendo comum o aparecimento de úlceras nos dedos, mandíbula, pele e patas (MOURIÑO et al., 2006). Nos girinos, observam-se pontos hemorrágicos e ulcerações na cauda e hemorragia nas patas emergentes (MOURIÑO et al., 2006). A taxa de mortalidade dessa bacteriose é variada, podendo resultar, na maioria das vezes, em problemas de locomoção dos animais acometidos e abscessos hepáticos (ALMEIDA et al., 2000).

A micobacteriose é outra doença de origem bacteriana que requer atenção. Causada por *Mycobacterium* spp., esta enfermidade está entre as mais comumente encontradas em animais de cultivo, inclusive em criações de rã-touro no Brasil (BARROS et al., 1988; FERREIRA et al., 2006). De importância zoonótica, estas bactérias são popularmente conhecidas como as causadoras do “Granuloma de piscina” ou “Doença do aquarofilista”; as lesões decorrentes da infecção geralmente ocorrem nas extremidades (mãos e pés) do homem após contato de pele "esfolada" à água contaminada. Geralmente, a micobacteriose é observada em animais adultos (MARTINHO & HEATLEY, 2012). Acredita-se que a sua transmissão ocorra por meio de contato direto entre indivíduos infectados, água contaminada ou ingestão de detritos aquáticos (FERREIRA et al., 2006). Em indivíduos imunocompetentes, a micobacteriose geralmente induz à infecção subclínica com poucos sinais clínicos. Por outro lado, em animais imunodeprimidos ou estressados, a infecção apresenta-se muito mais severa na qual Barros et al. (1988) observaram progressiva anorexia, apatia e perda de peso. As lesões são frequentemente acompanhadas pela presença de nódulos granulomatosos de cor esbranquiçada, localizados principalmente nos rins, fígado, baço e pulmões.

Bactérias do gênero *Streptococcus* também estão relacionadas com episódios de alta mortalidade em sistemas de criação intensiva de rã-touro. A septicemia causada por esta bacteriose causa diversos sinais clínicos como modificação da postura, diminuição da reação de estímulos externos, sistemas nervosos de incoordenação, desvio lateral da cabeça, edema, ascite, podendo estar associada também ao prolapso retal (MOSTÉRIO et al. 2014). Porém, há dúvidas em relação ao papel primário deste agente infeccioso, pois normalmente é encontrado como componente natural do ambiente (CUNNINGHAM et al., 1996).

Ranavirus (Iridoviridae) agrupa agentes infecciosos capazes de infectar vertebrados ectotérmicos como os anfíbios, principalmente suas formas larvais. Estes organismos são altamente virulentos e considerados uma ameaça emergente, pois estão relacionados a eventos

de mortalidade em anfíbios no mundo todo (HOVERMAN et al., 2010). Os ranavírus já foram detectados em raniculturas de *L. catesbeianus* no Brasil (MAZZONI et al., 2009) e são suspeitos de serem os agentes etiológicos de mortalidades registradas no cultivo de girinos da rã-touro por Galli et al. (2006). De acordo com a OIE (2007), geralmente as lesões causadas por *Ranavirus* no hospedeiro vêm acompanhadas de hemorragia sistêmica. Na sua forma crônica, a doença pode incluir ulceração na pele e necrose dos membros distais.

A Chytridiomicose é o nome dado à micose dérmica letal causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e está relacionada com mortalidade em massa e declínio populacional de várias espécies de anfíbios com distribuição global, tanto em animais silvestres, quanto em animais de criação. A rã-touro é considerada por muitos estudiosos como reservatório natural dessa espécie de fungo, isto é, ela pode hospedar o patógeno sem, no entanto, apresentar obrigatoriamente sinais de morbidade ou mortalidade. Dessa forma, estes somente se manifestam na referida espécie em casos de estresse e comprometimento do seu sistema imune. Os sinais clínicos típicos da enfermidade incluem: letargia, emagrecimento, eritema cutâneo, postura do corpo anormal e perda do reflexo de endireitamento (VOYLES et al., 2009). Segundo a OIE (2011), tanto *Ranavirus* quanto *B. dendrobatidis* são considerados agentes etiológicos de notificação obrigatória.

No Brasil, além dos agentes etiológicos supracitados, também já foram encontrados os seguintes parasitos: nematoide *Longibucca catesbeianae* (Cylindrocorporidae), oocistos do protozoário *Cryptosporidium* (Apicomplexa), o crustáceo *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) e larvas de moscas pertencentes à *Sarcophaga* e *Notochaeta*.

O nematoide *L. catesbeianae* é parasito do trato gastrointestinal de rã-touro e localiza-se principalmente no estômago e, em menor número, no intestino do seu hospedeiro. Este verme cilíndrico possui dimensões corporais reduzidas (média de 595 micrômetros de comprimento) e fêmeas larvíparas. Souza Jr. et al. (1993) observaram altos índices parasitológicos de *L. catesbeianus* em rã-touro selvagens e de cultivo no estado de São Paulo, com intensidades de infecção que variaram entre 2.500 a 10.726 parasitos por hospedeiro. Segundo Hipolito (2004), a presença do verme pode desencadear lesões gástricas e intestinais, sangramento e apatia nos hospedeiros infectados.

Devido a sua baixa especificidade de hospedeiro, o crustáceo *L. cyprinacea*, popularmente conhecido como verme-âncora é parasito de diversas espécies de peixes de água doce, assim como de anfíbios

(formas larvais). Sua presença é geralmente um problema em instalações aquícolas, onde a infestação pode ser potencialmente letal (KUPFERBERG et al., 2009). Em sistemas de girinagem, uma das vias mais comuns de introdução do parasito é por meio do uso de água contaminada por peixes selvagens parasitados ou introduzidos em açudes que abastecem a criação.

Durante ensaio de infestação experimental com *L. cyprinacea* em girinos de rã-touro, Martins & Souza Jr. (1995) observaram 100% de mortalidade dos mesmos entre o período de 72 a 96 horas após exposição inicial. Os parasitos fixaram-se principalmente na boca e cloaca dos girinos, onde foi possível observar alterações teciduais significativas, como prolapso anal e má formação dos membros posteriores.

Cabral et al. (2011) detectaram a presença de oocistos do protozoário *Cryptosporidium* sp. em raspagens da mucosa intestinal e amostras de fezes de rã-touro. Os autores atentam para a importância da realização de pesquisas epidemiológicas relacionadas ao parasito devido a possibilidade de sua transmissão ao homem (zoonose).

Na ranicultura, apesar do produtor fazer bom manejo e limpeza das baias onde ficam os animais, é provável que insetos sejam atraídos para o local. Esses insetos podem tanto ser inofensivos aos animais, como podem lhes trazer riscos à saúde. As moscas *Sarcophaga* e *Notochaeta* pertencem ao segundo grupo e podem ocasionar problemas graves de míase. Estes eram mais comuns no início da ranicultura, em que carcaças eram utilizadas para atrair moscas e alimentar as rãs. Neste caso, as moscas depositam seus ovos e as larvas emergentes são deglutidas pelas rãs, alojando-se na glote e língua, onde alimentam-se da sua carne e provocam feridas severas com consequente presença de infecções secundárias por bactérias (SOUZA Jr. et al., 1989). Atualmente, a presença desta doença é rara, porém, cuidados devem ser tomados para que a criação destes animais não seja prejudicada por eventuais casos de míase.

Tendo em vista a ampla distribuição de *L. catenulata* no Brasil (BOTH et al., 2011), registraram a espécie em 130 municípios brasileiros) e o fato dela estar classificada entre as cem piores espécies exóticas invasoras (LEVER, 2003), torna-se evidente a necessidade de um acompanhamento sanitário contínuo em raniculturas, assim como maior controle no transporte comercial desses animais. Diversos autores consideram a referida espécie como fonte notória de doenças infecciosas que podem, por sua vez, ser disseminadas às espécies nativas (SHARIFIAN-FARD et al., 2011). Por isso, estudos que promovam

maior entendimento no reconhecimento dos fatores envolvidos na dinâmica das principais doenças, assim como na sua prevenção, são importantes como forma de gerenciar ou reduzir os impactos negativos associados à enfermidades em raniculturas.

4. Manejo preventivo à enfermidade

Após a instalação da doença na propriedade, o seu controle e tratamento são difíceis e onerosos. A maioria das enfermidades que provocam grandes mortalidades ou deformações nos lotes são causadas por bactérias e tratadas com antibióticos. Porém, o uso inapropriado e/ou descontrolado deste quimioterápico oferece riscos, podendo levar à seleção de cepas patogênicas resistentes, presença de resíduos deixados na carne, aumento nos gastos de produção, além de poluição ambiental, entre outros (CABELLO, 2006). Na ranicultura, por exemplo, já foi observado resistência da cepa de *Streptococcus* sp. aos antibióticos cefalotina, oxacilina e penicilina, sugerindo que os ranários podem se tornar ambientes propícios ao desenvolvimento de bactérias resistentes (PILARSKI & SCHOCKEN-ITURRINO, 2010).

Como base nesta problemática, muitos países têm abolido o uso de antibióticos na produção animal, assim como a União Europeia desde o ano de 2006 (LÜCKSTÄDTS, 2006). No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014) já proibiu o uso de diversos antibióticos como aditivo alimentar na produção animal, a saber, cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003), quilononas e sulfonamidas (IN nº 26, 9/07/2009), espiramicina e eritromicina (IN nº 14, 17/05/2012).

As melhores medidas para o controle de enfermidades em ranários são profiláticas e preventivas. Como medidas profiláticas pode-se citar: uso de pedilúvio e rodolúvio com solução de hipoclorito de sódio na entrada da propriedade, instalações e entre setores; construir instalações para desinfecção e higiene pessoal (banheiros, lavatórios, vestuário, botas e luvas); limpar, desinfetar e esterilizar utensílios; privar-se de cantos e superfície abrasiva nas instalações de cultivo a fim de evitar injúria nas rãs (porta de entrada para infecções secundárias) e acúmulo de resíduos; ficar atento às densidades de estocagem nas diferentes fases de cultivo; evitar manipulação excessiva dos animais; certificar a procedência dos reprodutores antes da sua aquisição; não acondicionar os animais recém adquiridos imediatamente junto aos demais (período de quarentena); impedir a fuga dos animais para a natureza evitando possíveis problemas ecológicos; utilizar ração de

ótima qualidade e armazená-la em locais apropriados longe do chão evitando roedores, umidade e estocagem prolongada; acondicionar as sobras de rações, animais mortos e outros resíduos em sacos plásticos e eliminá-los por incineração; a cada ciclo de produção, esvaziar, desinfetar e realizar o vazio sanitário nas estruturas utilizadas; viabilizar o abastecimento hídrico de forma independente para cada tanque, a fim de prevenir a disseminação de patógenos; tratar a água de desuso da criação por meio de lagoa de decantação ou sedimentação para posterior eliminação junto ao corpo receptor de acordo com as normas do CONAMA; em caso de suspeita de doenças ou ferimentos, isolar os animais em instalações afastadas.

Entre as medidas preventivas, há destaque para a prática de vacinação e a utilização de aditivos alimentares, tais como: vitaminas C e E, imunoestimulantes, prebióticos e probióticos. Muitas destas medidas já estão sendo aplicadas na aquicultura, principalmente na piscicultura continental, onde se obtém resultados satisfatórios.

Vacinação é o termo utilizado para definir qualquer preparo com antígeno proveniente de um organismo patogênico, capaz de estimular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo da espécie animal de interesse, conferindo-lhe aumento de resistência e proteção duradoura contra infecções (viral, bacteriana ou fúngica) sem o desenvolvimento prévio de enfermidades (*vide* revisão MAGNADOTTIR, 2010). Nos últimos 10 a 20 anos, essa prática vem se estabelecendo em animais de cultivo, embora ainda de forma incipiente em anfíbios. Dentre os diversos modos utilizados para o preparo de vacinas, há destaque para as inativadas, de DNA, "ghosts" e as atenuadas. As formas de administrações mais frequentes são: por imersão, injeção (intraperitoneal) ou até mesmo via oral por gavagem (isto é, introdução do antígeno por meio de ingestão forçada) ou na alimentação (*vide* revisão MAGNADOTTIR, 2010; PRIDGEON & KLESIUS, 2010).

Em experimento realizado com o objetivo de testar se a rã africana albina *Xenopus laevis* produziria imunoglobulinas IgX em resposta à imunização via gavagem, Du et al. (2012) observaram regulação positiva de IgX, dizendo com a premissa de que IgX é análoga funcional da IgA de mamíferos onde, sabidamente, atua na proteção das células epiteliais do hospedeiro contra micro-organismos invasores como vírus e bactérias. Contudo, os autores alertam para a necessidade de maiores estudos a fim de elucidar melhor a relação entre IgX e IgA.

De outra forma, estudos de imunização de rã de perna amarela da montanha *Rana muscosa* contra *Batrachochytrium dendrobatidis* por

injeção do fungo morto diluído em formalina e contendo adjuvante não apresentaram diferenças significativas no tempo de infecção, prevalência, intensidade de infecção ou mortalidade dos hospedeiros (STICE & BRIGGS, 2010). Não obstante, recentemente foi desenvolvida uma vacina contra *B. dendrobatidis* mais eficaz e duradoura quando comparada ao trabalho mencionado anteriormente e ao tratamento convencional feito por meio de fungicidas (terapias de curta duração e com riscos de provocar mortalidades em outros organismos). Tal vacina foi desenvolvida com o fungo morto por congelamento; as células fúngicas foram então colocadas sobre a pele de pererecas cubanas *Osteopilus Septentrionalis* por várias vezes e, posteriormente, foram infectadas com o fungo vivo. Os autores concluíram que as rãs que haviam recebido mais vezes a vacina apresentaram menos células fúngicas vivas por grama de tecido, confirmando que a mesma é eficaz (COGHLAN, 2014).

Além da prática de vacinação, micronutrientes antioxidantes como vitaminas A, C e E, carotenóides e alguns minerais são comumente aplicados como aditivos alimentar preventivos na dieta. Sabe-se que a deficiência de vitamina C pode levar à imunossupressão e susceptibilidade à infecção por agentes infecciosos, ao passo que a insuficiência de vitamina E pode acarretar em condições degenerativas de células não específicas. Diferentemente, níveis acima da exigência do animal aumentam a resposta imune e oferecem resistência contra doenças (KIRON, 2012).

Girinos de rã-touro suplementados com diferentes níveis de vitamina C ou E (50, 250 e 500 mg/kg de ração), não apresentaram diferenças significativas sobre o crescimento dos animais independente da vitamina e da sua quantidade incluída na ração. Entretanto, a adição de 500 mg de vitamina C proporcionou a melhor taxa sobrevivência nos girinos (62,83%) em comparação ao grupo controle. Os dados sugerem que a adição de 500 mg de vitamina C/kg ração podem melhorar a sobrevivência de girinos *L. catesbeianus* (DE STÉFANI et al., 2001).

Diferentemente do trabalho supracitado, Colombano et al. (2007) apontam que a suplementação de vitamina C pra girinos de *L. catesbeianus* deve ser 2.000 mg/kg de ração, pois esta concentração promoveu melhorias na taxa de sobrevivência (93%), crescimento específico (6,03% ao dia), ganho de peso (4,22) e porcentagem de metamorfose.

Já estudos realizados com rã-touro pós-metamorfose (imago) suplementada com diferentes níveis de vitamina C (0, 250, 500, 750, 1.000 e 2.000 mg/kg de ração), inferiram não haver influência da adição

dessa suplementação sobre a conversão alimentar, crescimento, sobrevivência, níveis de leucócitos, de corticosterona no plasma (indicador de estresse) e de macrófagos ativos. Estes níveis de corticosterona indicam possível adaptação às condições de cativeiros destes animais pós-metamorfose (KNOOP et al., 2011; KNOOP et al., 2014).

Os imunoestimulantes são compostos que modulam o sistema imunológico inato do hospedeiro, conferindo ao mesmo aumento de resistência a doenças causadas por agentes patogênicos por meio da estimulação direta dos receptores de células e/ou genes ligados ao referido sistema. Assim, não produzem nenhum componente de memória e a resposta é de curta duração (ENCARNAÇÃO, 2010), sendo geralmente incluída na dieta durante operações estressantes na aquicultura como classificação, transferência, vacinação ou ao longo das fases cruciais de vida do animal para ajudá-lo a manter boa saúde (KIRON, 2012).

Os imunoestimulantes mais utilizados atualmente na aquicultura são fragmentos de parede celular de padrões moleculares associados a patógenos como: beta-glucanas de fungos, peptidoglicanos de bactérias Gram positivas, lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas e nucleotídeos de vírus (ENCARNAÇÃO, 2010). Em experimento realizado com rã-touro suplementada com beta-glucanas e submetida à condição de estresse por meio de diferentes densidades de estocagem, Freitas et al. (2014) concluíram que o imunoestimulante teve papel hepato-protetor, reduzindo os efeitos estressores sobre o fígado.

Os probióticos são ingredientes não digeríveis pelas enzimas do hospedeiro, como a inulina e os fruto-oligosacarídeos, que são utilizados como substratos e fermentados pela flora bacteriana do trato digestivo. Esta fermentação origina substâncias que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas, particularmente as bifidobactérias e lactobacilos, melhorando o equilíbrio intestinal do hospedeiro e inibindo a colonização por bactérias patogênicas (ENCARNAÇÃO, 2010).

5. Probióticos com ênfase no desempenho zootécnico de rãs

Os probióticos na aquicultura são definidos como células microbianas que, ao serem adicionadas na alimentação, colonizam e se mantêm vivas no trato digestório dos animais, de modo a melhorar a condição de saúde dos mesmos, agindo de maneira preventiva (GATESOUBE, 1999). Estes podem atuar das seguintes formas: a)

competir pelos nutrientes e/ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas; b) alterar a composição da comunidade bacteriana, ao promover melhorias na saúde dos animais; c) excluir o organismo patogênico devido a alguma competição; d) contribuir com fonte nutricional e/ou na digestão enzimática; e) melhorar os parâmetros zootécnicos (*vide* revisão de BALCÁZAR et al., 2006).

No âmbito da aquicultura, são diversos os estudos que têm demonstrado efeitos positivos à saúde do animal cultivado, quando se utilizam dietas suplementadas com bactérias probióticas. Este é o caso dos resultados de Dias et al. (2008; 2010) com rã-touro pós-metamorfose suplementada com probióticos comerciais P1- *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* 3×10^6 UFC·g⁻¹ e P2- *Bacillus subtilis* 10^9 UFC·g⁻¹ e em duas dosagens (10 g·Kg⁻¹ e 5 g·kg⁻¹). Neste estudo, os autores observaram aumento no ganho de peso, redução do ciclo produtivo em 28 dias e efeito imunomodulador decorrente do aumento da capacidade fagocítica. Em contrapartida, não averiguaram melhorias ou alterações nos parâmetros hematológicos, na conversão alimentar e na taxa de crescimento específico.

Devido a não regularidade dos efeitos benéficos dos probióticos comerciais aplicados na ranicultura, tem-se buscado isolar e selecionar bactérias possivelmente probióticas do próprio trato intestinal do animal em questão, ou seja, espécie-específicas. Neste sentido, Mendoza et al. (2012), selecionaram um grupo de bactérias ácido-láticas potencialmente probióticas da cloaca, da pele dorsal e ventral de *L. catsebianus*. Identificaram-nas como *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus gallinarum*. Observaram que as culturas destes micro-organismos reduziram o pH entre 3,74 e 5,54, e a atividade antimicrobiana do sobrenadante desaparecia quando este era neutralizado, indicando que a inibição dos patógenos era decorrente dos ácidos orgânicos. Divergentemente, a cepa de *Enterococcus* spp. manteve seus efeitos inibitórios contra *Staphylococcus epidermidis* e *L. monocytogenes* demonstrando que o H₂O₂ e/ou algum tipo de bactericina poderiam também estar participando da atividade antimicrobiana. Segundo o teste de compatibilidade realizado pelos referidos autores, todas as cepas, com exceção da *E. gallinarum*, que inibiu as outras, podem ser adicionadas juntas como mix, pois não apresentaram antagonismo entre si.

Nesta mesma linha de pesquisa tem-se buscado entender as propriedades benéficas destes probióticos. Foi o que Pasteris et al.

(2014) procuraram em seu trabalho, caracterizando as bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 isolada de girinos de *L. catesbeianus*. Os autores averiguaram que a cepa CRL 1584 foi capaz de inibir o crescimento das bactérias patogênicas *Citrobacter freundii* e *Listeria monocytogenes* devido à liberação de produtos como: ácido-lático, peróxido de hidrogênio e diversos tipos de bactericinas moleculares. Os testes químicos indicaram que as bactericinas do sobrenadante eram proteinases naturais. Estes e outros resultados encontrados neste trabalho auxiliam no aumento do conhecimento sobre as bactericinas tendo em vista o seu potencial de inclusão em probióticos na ranicultura ou como biopreservacionista.

Além disso, todas estas investigações podem representar um ponto de partida, a fim de se avaliar o potencial de aplicabilidade de probióticos em prevenção à diversas doenças infecciosas relacionadas às mortalidades e perdas econômicas nas raniculturas, e no declínio global de diversas espécies de anfíbios (MENDOZA et al., 2012).

JUSTIFICATIVA

A intensificação da produção de forma desordenada atrelada à falta de manejo sanitário, alimentações inapropriadas, ausência de vazios sanitários e medidas profiláticas, entre outras, podem resultar no desenvolvimento de enfermidades. As doenças de origem bacteriana têm grande importância na aquicultura devido à sua rápida proliferação, mortalidades elevadas e conseqüentemente surtos em curto intervalo de tempo, ou ainda, podem-se desenvolver lentamente, com menor patogenicidade e resistir ao um longo período, provocando grandes perdas econômicas na ranicultura.

Para a continuidade do crescimento da ranicultura, é necessário o desenvolvimento de estratégias para a minimização dos efeitos negativos das enfermidades de cunho bacteriano nos cultivos. Uma nutrição adequada é essencial no enfrentamento de enfermidades, na manutenção do desempenho zootécnico e da saúde das rãs. Além disso, é evidente que o uso de dietas balanceadas suplementadas com vitaminas, aminoácidos, minerais e aditivos alimentares, melhora a saúde das rãs em cativeiro e sua resistência aos patógenos do ambiente de cultivo. Alguns aditivos alimentares como os probióticos são alternativas mais biosseguras ao uso de antibióticos nas fazendas aquícolas. Uma vez que, os probióticos não estimulam a seleção de bactérias resistentes e sim o crescimento de bactérias benéficas no intestino, melhora a imunocompetência do animal, auxilia na

diminuição de impactos ambientais, traz benefícios zootécnicos aos cultivos, conseqüentemente acarreta incremento na renda dos produtores e promove o desenvolvimento da atividade de modo mais sustentável.

O desenvolvimento de probióticos autóctones, isolados do trato intestinal de rãs, frente à inibição de bactérias patogênicas específicas, constitui grande esperança para reduzir as enfermidades de origem bacterianas na ranicultura. Estudos que relacionam o isolamento, seleção e suplementação de bactérias autóctones potencialmente probióticas para rãs cultivadas, sobre os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e morfologia intestinal são raros.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Contribuir para o progresso da ranicultura com informações a certa da seleção e suplementação de bactéria autóctone potencialmente probiótica para rãs (*Lithobates catesbeianus*), sobre morfologia intestinal, parâmetros zootécnicos e microbiológicos associados à utilização deste micro-organismo em dietas comerciais.

Objetivos Específicos

- Isolar bactérias ácido-láticas autóctones do trato intestinal de rã-touro.
- Selecionar ao menos uma bactéria ácido-lática autóctone com potencial probiótico através de testes *in vitro*.
- Avaliar a produção enzimática da bactéria ácido-lática autóctone com maior potencial probiótico (escolhida na etapa anterior).
- Avaliar a viabilidade de incorporação da bactéria ácido-lática em ração comercial para girinos
- Avaliar a colonização do trato intestinal dos girinos alimentadas com dieta comercial suplementada com a bactéria ácido-lática autóctone potencialmente probiótica.
- Avaliar o potencial probiótico da suplementação da bactéria ácido-lática autóctone em dieta comercial para girinos sobre os parâmetros zootécnicos e na morfologia intestinal.

HIPÓTESE

Será possível isolar e selecionar ao menos uma cepa de bactéria ácido-lática autóctone potencialmente probiótica. A suplementação da bactéria ácido-lática autóctone, selecionada *in vitro*, em dietas para girinos de rã-touro trará benefícios zootécnicos, colonizará a ração e o trato intestinal em altas concentrações, alternado as características morfológicas do epitélio intestinal.

FORMATAÇÃO

Capítulo 1 está presente na seguinte publicação: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). Aquicultura no Brasil: novas perspectivas para a produção. São Carlos, Pedro & João Editora, 2015.

Capítulo 2 está formatado segundo as normas da revista *Journal of Applied Microbiology*, a qual o artigo será submetido.

Capítulo 3 está formatado segundo as normas da revista *Aquaculture Research*, a qual o artigo será submetido.

CAPÍTULO 2

Isolamento e seleção de bactérias autóctones com potencial probiótico do trato intestinal de rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw 1802)

Scheila Anelise Pereira¹, Gabriela Tomas Jerônimo¹, Natália da Costa Marchiori², Felipe Nascimento Vieira³, José Luiz Pereira Mourião¹

¹Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil.

²Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú, Rua Joaquim Garcia, s/n, Centro, CEP 88340-000, Camboriú, SC, Brasil

³Laboratório LCM- Laboratório de camarões marinhos, Setor de Microbiologia, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Beco dos Coroas 503, Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, Brasil. Autor para correspondência: schepereira@gmail.com

“Running title”: Indigenous bacteria in *Lithobates catesbeianus*

Abstrat

Alternatively the applicant and indiscriminate use of antibiotics to control bacterial diseases in aquaculture, the aim is to present the development of alternative and effective biotechnological methods to combat diseases. One option may be supplemental commercial diets with probiotic bacteria indigenous to specific use as microbial control agents. Given this, the aim of this study was to isolate and select an indigenous bacterium with probiotic potential of bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Initially, they isolated 20 strains of bacteria. Of these, eleven were not discarded by produce lactic acid in the culture medium. The remaining nine strains were subjected to the following *in vitro* assays: antagonism against pathogenic bacteria, antimicrobial title extracellular products, tolerance to bile salts, lowering the pH, protease sensitivity to the antimicrobial tetracycline, cell viability, growth rate and doubling time. From these data, it was defined ideotype (ideal strain proposal) through the best results of each test strain *in vitro*. For this, the

distances were estimated Mahalanobis (D^2) between all worked strains compared to ideotype and are considered the best candidates those with the shortest distance of ideotype. The strain of *Lactobacillus plantarum* showed the best results for most tests, confirmed by smaller Mahalanobis distance. However, other studies to favor use of the microorganism as a supplement in commercial diets for *L. catesbeianus* should be performed in order to elucidate their potential probiotic effects *in vivo*.

Keywords: lactic acid bacteria, pathogen inhibition, antagonism, protease, bile salts, growth rate, doubling time.

Resumo

Em alternativa ao uso recorrente e indiscriminado de antibióticos para o controle de bacterioses na aquicultura, busca-se atualmente o desenvolvimento de métodos biotecnológicos alternativos e eficazes no combate a enfermidades. Uma opção pode ser a suplementação de dietas comerciais com bactérias autóctones probióticas para uso específico como agentes de controle microbiano. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar uma bactéria autóctone com potencial probiótico de rã-touro *Lithobates catesbeianus*. Inicialmente, foram isoladas 20 cepas de bactérias. Destas, onze foram descartadas por não produzirem ácido-lático em meio de cultura. As nove cepas restantes foram submetidas aos seguintes testes *in vitro*: antagonismo frente a bactérias patogênicas, título antimicrobiano dos produtos extracelulares, tolerância à sais biliares, redução do pH, protease, sensibilidade ao antimicrobiano tetraciclina, viabilidade celular, velocidade de crescimento e tempo de duplicação. A partir destes dados, foi definido o ideótipo (cepa ideal proposta), por meio dos melhores resultados de cada cepa nos teste *in vitro*. Para isto, foram estimadas as distâncias de Mahalanobis (D^2) entre todas as cepas trabalhadas comparadas ao ideótipo, sendo consideradas as melhores candidatas as que apresentaram menor distância do ideótipo. A cepa de *Lactobacillus plantarum* apresentou os melhores resultados para a maioria dos testes realizados, confirmado pela menor distância de Mahalanobis. Entretanto, outros estudos visando à viabilidade do uso deste microorganismo como suplemento em dietas comerciais para *L. catesbeianus* devem ser realizados, a fim de elucidar seus potenciais efeitos probióticos *in vivo*.

Palavras chaves: Bactéria ácido-lática, inibição de patógeno, antagonismo, protease, sais biliares, velocidade de crescimento, tempo de duplicação.

Introdução

A ranicultura é uma atividade agroindustrial promissora e tem atraído cada vez mais o mercado consumidor e produtor devido às características zootécnicas e organolépticas da rã, como rápido crescimento, alta prolificidade, rusticidade, excelente qualidade de carne, baixo teor de gordura e colesterol, elevados níveis de proteína (Pires *et al.* 2006; Nobrega *et al.* 2007; Afonso 2012; Moreira *et al.* 2013). Devido a estes atributos, a rã-touro *Lithobates catesbeianus* é a espécie animal, dentre os anfíbios, mais produzida no mundo, incluindo o Brasil (FAO 2015).

Entretanto, vários são os entraves na produção dessa espécie, principalmente os decorrentes do canibalismo, desnutrição, estresse, instalações e manejos inapropriados os quais podem debilitar o sistema imune e aumentar a susceptibilidade a doenças (Feix *et al.* 2006). As doenças de origem bacteriana são as de maior impacto no cultivo, provocando altas mortalidades e deformidades nos lotes. Dentre os agentes patogênicos, pode-se citar, *Citrobacter freundii* (Pasteris *et al.* 2011), *Aeromonas hydrophila* (Mouriño *et al.* 2006) e *Pseudomonas aeruginosa* (Grenard 2007) causadoras da “síndrome da perna vermelha”.

Para tratar doenças desta etiologia nas unidades de cultivo, são empregados comumente os antibióticos. Porém, o uso inapropriado e demasiado deste quimioterápico pode levar a seleção de cepas resistentes a uma ampla gama de antibióticos, além de poder deixar resíduos na carne do animal produzido, aumentar os gastos de produção e ainda causar poluição ambiental (Cabello 2006). Alternativamente ao uso de antibióticos, busca-se desenvolver novas ferramentas biotecnológicas para enfrentar os possíveis surtos de doenças e períodos de estresse na produção animal. Uma possibilidade seria a utilização de aditivos alimentares como os probióticos, que têm se mostrado promissores no combate a surtos de bacterioses em diversos organismos cultivados na aquicultura (Ringo *et al.* 2003; Gatesoupe 2008; Merrifield *et al.* 2010; Mouriño *et al.* 2012).

A ranicultura tem-se apropriado da utilização de probióticos, que na sua grande maioria são probióticos comerciais que não foram isolados e selecionados para a espécie animal de rã (Dias *et al.* 2008; Franca *et*

al. 2008; Dias *et al.* 2010). Por estes micro-organismos não serem espécie específicos, podem não apresentar boa regularidade em seus efeitos, e até mesmo não serem capazes de colonizar o trato gastrointestinal de maneira eficiente (Nayak 2010). Devido a estas razões, procura-se isolar e selecionar bactérias potencialmente probióticas do próprio trato intestinal do animal, isto é, bactérias autóctones espécie específicas. Dentre a ampla variedade de bactérias autóctones possivelmente probióticas isoladas e selecionadas do trato intestinal de animais saudáveis, pode se destacar as bactérias ácido-láticas por serem naturalmente encontradas na microbiota intestinal de espécies aquáticas (Hagi *et al.* 2004), serem de fácil manipulação, produzirem compostos antimicrobianos e por estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (Ringo e Gatesoupe 1998).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar *in vitro* cepas de bactérias ácido-láticas autóctone com potencial probiótico do trato intestinal de rã-touro *Lithobates catesbeianus*.

Materiais e Métodos

1. Aquisição dos animais

Vinte e três espécimes de *L. catesbeianus* assintomáticas (295,077±88,77 g) foram coletados de um cultivo comercial, localizado no município de Antônio Carlos, Santa Catarina, Brasil (27°31'0''S, 48°46'4''O) e encaminhados para a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00936 CEUA/UFSC).

2. Isolamento e seleção de bactérias autóctones potencialmente probióticas

Os animais foram insensibilizados em gelo e anestesiados com lidocaína a 5%. Em seguida, os mesmos foram pesados, eutanasiados por comocão cerebral e seus intestinos extirpados assepticamente e lavados com solução salina estéril (0,65% de NaCl) com auxílio de micropipeta para remoção de bactérias não aderidas à parede intestinal (alóctones). O tecido foi separado em três partes, mas somente a porção média do trato foi utilizada. Esta foi colocada em tubos de ensaio contendo o meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) (HIMEDIA®) e

incubada em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h. Os tubos de ensaio que apresentaram crescimento bacteriano foram semeados, pelo método de estria por esgotamento, em placas de Petri com meio de cultura Agar MRS com 1% de azul de anilina e posteriormente incubados a 35 °C por 48 h. Após o crescimento bacteriano, as colônias com coloração azul foram avaliadas quanto sua morfologia e as que apresentaram características compatíveis às do gênero *Lactobacillus* foram selecionadas.

3. Atividade da catalase

A atividade da catalase foi testada por meio da adição de peróxido de hidrogênio 40% sobre as colônias das cepas potencialmente probióticas, previamente cultivada em MRS (Condon 1987).

4. Inibição de patógenos *in vitro*

As cepas de bactérias patogênicas utilizadas para determinação do antagonismo *in vitro* foram: *Aeromonas hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM), *A. hydrophila subsp. hydrophila* (ATCC 7966) e *Escherichia coli* (D363). Estas cepas foram reativadas em Infuso de Cérebro e Coração (BHI), semeadas em Ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia®) a 30 °C por 24 h, através da técnica de estria por esgotamento e posteriormente avaliadas pelo método de Gram para confirmar sua pureza.

As cepas potencialmente probióticas selecionadas foram avaliadas quanto à inibição do crescimento das bactérias patogênicas supracitadas, de acordo com a técnica de Difusão de Discos em Ágar (Clinical e Laboratory Standards Institute 2013). As cepas candidatas à probióticas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar MRS e incubadas a 35 °C por 48 h. Após o crescimento bacteriano destas cepas, discos de aproximadamente 0,8 mm foram retirados. As cepas patogênicas, previamente crescida em BHI, foram semeadas em placa de Petri contendo o meio de Ágar Mueller-Hinton (MH). Após isso, os discos confeccionados de cada cepa candidata à probiótica foram colocados sobre a bactéria patogênica recém-semeada, na sequência foram incubadas a 30 °C por 24 h. A atividade antagônica é expressa pelo diâmetro em milímetros da zona de inibição, região clarificada ao redor dos discos de ágar de cada cepa potencialmente probiótica.

5. Definição da concentração da bactéria patogênica para o título da mínima concentração inibitória dos produtos extracelulares

As bactérias patogênicas CPQBA 228-08 DRM e ATCC 7966 foram incubadas em meio de cultura pobre (PB, do inglês *poor broth*, 1% de peptona e 0,5% de NaCl) a 30 °C por 24 h. Posteriormente, verificou-se a concentração inicial do inóculo, através da curva de crescimento microbiana previamente realizada, para tomar como base na diluição seriada. As cepas candidatas à probióticas foram incubadas em MRS líquido a 35°C por 24h. Logo após, foram centrifugadas a 4.000 x g por 30 min a 4°C, para obter os produtos extracelulares.

Em seguida, procedeu-se diluição seriada das bactérias patogênicas no meio de cultura PB e em microplacas de fundo chato de 96 poços, no fator de 1:2, na sequência foi adicionado os produtos extracelulares de cada cepa candidatas à probióticas. As microplacas foram incubadas a 30 °C por 24 h e posteriormente aferiu-se a absorbância em 630 nm. A concentração da bactéria patogênica utilizada, no teste da atividade antimicrobiana dos produtos extracelulares, foi determinada pela diluição máxima que os produtos extracelulares de cada cepa candidatas à probióticas conseguiram inibir o crescimento das cepas CPQBA 228-08 DRM e ATCC 7966.

Após a determinação da concentração das bactérias patogênicas, procedeu-se o teste da mínima concentração dos produtos extracelulares (MIC) capaz de inibir, separadamente, as duas cepas de *A. hydrophila*. O teste foi realizado em microplaca de fundo chato de 96 poços, onde diluiu seriadamente os produtos extracelulares de cada cepa candidatas à probióticas, em meio de PB no fator de 1:2. Na sequência, colocou-se a bactéria patogênica na concentração previamente determinada de 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC·ml⁻¹) em todos os poços e incubou-se as microplacas em estufa a 30°C por 24h. O título antimicrobiano do sobrenadante foi recíproco a última diluição com atividade bactericida ou bacteriostática.

6. Tolerância aos sais biliares, redução do pH, produção de protease e sensibilidade à tetraciclina

As cepas selecionadas foram incubadas a 35 °C por 24 h em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS adicionados de 5% de sais biliares (bile bovina) (Cai *et al.* 1999). Este ensaio foi realizado em triplicata para cada bactéria, sempre contendo um tubo extra para o

controle positivo, ou seja, sem adição de sais biliares. Posteriormente, 100 µl de cada tubo de ensaio de cada bactéria foram transferidos à microplacas de 96 poços (fundo chato) estéreis para verificar as absorbâncias a 630 nm. A porcentagem de diminuição de absorbância de cada cepa em relação ao seu controle positivo foi determinada como a tolerância das mesmas aos sais biliares. Os resultados são expressos em porcentagem de perda de viabilidade celular frente à adição dos sais biliares.

As cepas candidatas a probióticas foram avaliadas, também, quanto à capacidade de reduzir o pH do meio de cultura MRS. De forma indireta avaliou-se o quanto de ácidos orgânicos das dadas bactérias produziriam. Para tal, foi medido o pH do meio de cultura estéril em triplicata. Após, inoculou-se as cepas candidatas em MRS a 35 °C por 24 h, em triplicata. Após, o crescimento bacteriano de cada tubo de ensaio, aferiu-se o pH e a pureza da cepa pelo método de Gram.

Todas as bactérias potencialmente probióticas foram testadas quanto à produção de protease através da degradação do leite desnatado em placas de ágar de leite desnatado. As cepas foram semeadas, primeiramente em MRS ágar a 35 °C por 48 h. Posteriormente, foram retirados discos do MRS com as bactérias previamente crescidas (0,8 mm) e as colocou em quadruplicata, sobre as placas de ágar de leite desnatado e foram incubadas a 35 °C por 24 h. A produção da enzima foi calculada pela zona clarificada ao redor dos discos, com o auxílio de paquímetro.

A susceptibilidade das cepas candidata a probióticas ao antimicrobiano tetraciclina foi determinada baseando-se na técnica de difusão em disco de MRS (Clinical e Laboratory Standards Institute 2013). As placas com os inóculos e os discos de tetraciclina foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 h. Após esse período, os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro.

7. Cinética de crescimento e viabilidade celular

As cepas candidatas à probióticas foram incubadas em triplicata em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura líquido MRS e mantidos a 35 °C por 24 h. O monitoramento do crescimento bacteriano foi realizado a cada duas horas, pela leitura de 100 µL de cada amostra em leitor de microplacas a 630 nm. A concentração do inóculo foi transformada em UFC·mL⁻¹ a partir de uma curva padrão previamente realizada para cada cepa. A partir destes resultados, foi calculada a

velocidade máxima de crescimento e tempo de duplicação, segundo as seguintes equações:

Velocidade máxima:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(Z) - \ln(Z_0)}{dt}$$

Onde: μ_{\max} = velocidade máxima de crescimento

Z = concentração (UFC·mL⁻¹)

Z₀ = concentração inicial do inóculo (UFC·mL⁻¹)

dt = tempo de cultivo (horas) Tempo de duplicação:

$$t_{dup} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

Onde: t_{dup} = tempo de duplicação (horas)

μ_{\max} = velocidade máxima de crescimento

Após 24 h de crescimento bacteriano, amostras de todos os tubos de ensaio foram semeadas em meio de cultura ágar MRS pela técnica de diluições seriadas e incubadas a 30 °C por 48 h para determinar a viabilidade celular. Passado este período, foram estimadas as unidades formadoras de colônia (UFC·mL⁻¹).

8. Caracterização bioquímica

Para caracterização fenotípica foi analisado o perfil bioquímico da cepa bacteriana com maior potencial probiótico dentre as analisadas, utilizando kit de identificação API 50CHL (BioMerieux®) e a metodologia do fabricante.

9. Análise estatística

Os resultados dos caracteres avaliados foram submetidos a análise de variância unifatorial, segundo o delineamento inteiramente ao caso, com três repetições. Posteriormente, a média das variâncias foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott, ao nível de significância de 5%. Caracteres avaliados em porcentagem foram transformados em arco seno e contagem de células bacterianas viáveis em log na base dez. Em seguida, foi definido uma cepa ideal (ideótipo proposto) através das maiores médias dentre as cepas avaliadas para os caracteres de halo de inibição de patógenos, título antimicrobiano dos produtos extracelulares, porcentagem de redução do pH, produção de protease, sensibilidade a tetraciclina, velocidade de crescimento e contagem final de células bacterianas, e das menores médias para resistência a sais biliares (5%) e

tempo de duplicação. Em seguida, as distâncias de Mahalanobis (D_2) foram estimadas a partir da padronização dos dados das cepas estudadas e o ideótipo, com o auxílio do programa computacional Genes (Cruz 1998). Desta forma, as cepas foram classificadas de acordo com o índice de seleção da distância ao ideótipo, ou seja, a distância que apresentaram em relação ao ideótipo, sendo consideradas as melhores cepas as que apresentaram as menores distâncias.

Resultados

1. Isolamento e seleção de bactérias potencialmente probióticas

Foram isoladas 20 cepas de bactérias autóctones de rã-touro através da observação da morfologia, coloração pelo método de Gram e formação de colônias azuis em meio de cultura MRS ágar com azul de anilina pela produção de ácido-lático. Destas apenas as cepas R1, R2, R3, R4, R5, R6, R16, R17, R17.1 e R18 foram selecionadas.

2. Atividade de catalase

A maioria das cepas (R1, R2, R4, R5, R6, R11, R16, R17 e R18) foram negativas para o teste da catalase e apenas duas foram positivas (R3 e 17.1) as quais foram, conseqüentemente, descartadas.

3. Inibição de patógenos *in vitro*

As cepas avaliadas apresentaram grande variabilidade fenotípica, evidenciada pela diferença significativa ($p < 0,05$), observada pela análise de variância do antagonismo (Tabela 1) frente aos patógenos *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* (ATCC 7966), *A. hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM) e *Escherichia coli* (D363). A R2 apresentou inibição superior contra ATCC 7966, em comparação às demais cepas. Quanto à inibição da CPQBA 228-08 DRM as cepas que apresentaram elevado desempenho foram a R1 e R17, em relação às demais bactérias. Em relação à D363, as cepas que obtiveram melhores resultados foram R4, R6 e R17.

Tabela 1: Antagonismos das cepas bacterianas selecionadas do trato intestinal de rã-touro *Lithobates catesbeianus* adulta e assintomática contra as *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli**

Cepas	Antagonismo contra <i>A. hydrophila subsp.</i> <i>hydrophila</i> ATCC 7966 (mm)	Antagonismo contra <i>A. hydrophila</i> CPQBA 228-08 DRM (mm)	Antagonismo contra <i>Escherichia coli</i> D363 (mm)
R1	11,83±0,28 ^e	13,50±1,32 ^a	0,00 ± 0,00 ^c
R2	16,33±0,57 ^a	10,00±0,50 ^b	9,00± 0,00 ^b
R4	13,58±0,52 ^c	10,16±0,29 ^b	10,00± 1,00 ^a
R5	15,00±0,00 ^b	9,00±0,00 ^b	8,83± 0,289 ^b
R6	13,83±0,28 ^c	10,66±0,58 ^b	10,00± 0,00 ^a
R11	14,00±1,32 ^c	9,83±0,29 ^b	8,33± 0,577 ^b
R16	13,00±0,00 ^d	10,00±0,50 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
R17	14,00±0,00 ^c	13,33±0,58 ^a	9,83± 0,289 ^a
R18	12,66±0,57 ^d	10,33±0,29 ^b	0,00 ± 0,00 ^c

*Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

4. Definição da concentração da bactéria patogênica para o título da mínima concentração inibitória dos produtos extracelulares

As cepas apresentaram variabilidade fenotípica para o caráter MIC. A bactéria que apresentou os resultados em maior inibição frente aos os micro-organismos patogênicos testados foi a R16 (p<0,05) (Tabela 2).

Tabela 2: Título da mínima concentração inibitória (MIC) dos produtos extracelulares das cepas bacterianas selecionadas do trato intestinal de rã-touro *Lithobates catesbeianus* adulta e assintomática em Log₂ contra duas variedades de bactérias patogênicas: *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (ATCC 7966) e *A. hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM).

Cepas	MIC contra <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (ATCC 7966)	MIC contra <i>A. hydrophila</i> (CPQBA 228-08 DRM)
R1	2,99±0,01 ^b	2,99±0,01 ^b
R2	3,99± 0,01 ^a	2,99±0,01 ^b
R4	2,99±0,01 ^b	3,99±0,01 ^a
R5	2,99±0,01 ^b	2,99±0,01 ^b
R6	2,99±0,01 ^b	2,99±0,01 ^b
R11	2,99±0,01 ^b	2,99±0,01 ^b
R16	3,99±0,01 ^a	3,99±0,01 ^a
R17	2,99±0,01 ^b	1,99±0,01 ^c
R18	2,99±0,01 ^b	2,99±0,01 ^b

*Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

5. Tolerância aos sais biliares, porcentagem de redução do pH, produção de protease e sensibilidade à Tetraciclina

As cepas candidatas a probióticas testadas apresentaram variabilidade fenotípica pra os caracteres tolerância a sais biliares (5%), porcentagem de redução do pH e sensibilidade ao antimicrobiano tetraciclina (Tabela 3).

Após o crescimento celular microbiano em meio de cultura com a adição dos sais biliares, todas as bactérias testadas apresentaram grandes perdas de viabilidade celular. Entretanto, as cepas R1, R4, R5 e R6 apresentaram maior tolerância aos sais biliares ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Na porcentagem de redução do pH do meio de cultura, foi observado maior redução desse caráter nas cepas R2, R4, R5, R11 e R16 (Tabela 3). A bactéria R17 apresentou a menor capacidade de reduzir o pH do meio de cultura.

Dentre as cepas de bactérias testadas quanto à capacidade de produção de protease pelo método indireto pode-se destacar a R16 com maior halo de degradação da proteína do leite. Já para a sensibilidade ao antibiótico tetraciclina, as cepas que apresentaram os maiores halos foram a R1, R2, R5, R16, R17 e R18, ou seja, maior sensibilidade a este antimicrobiano (Tabela 3).

Tabela 3: Tolerância a sais biliares (5%), porcentagem de redução do pH, produção de protease e sensibilidade à tetraciclina (TET) das cepas bacterianas selecionada do trato intestinal de rã-touro *Lithobates catesbeianus* adulta e assintomática.

Cepas	Tolerância a sais biliares (5%) (%)	Porcentagem de redução do pH (%)	Produção de protease (mm)	Sensibilidade a TET (mm)
R1	74,42±0,02 ^a	29,06±0,00 ^b	12,00±1,73 ^b	12,17±0,29 ^a
R2	84,77±0,01 ^b	30,06±0,00 ^a	9,33±0,58 ^c	11,33±0,58 ^a
R4	70,64±0,02 ^a	29,81±0,00 ^a	9,00±0,00 ^c	9,67±0,58 ^b
R5	74,81±0,06 ^a	29,71±0,00 ^a	10,00±0,00 ^c	11,33±0,58 ^a
R6	80,36±0,03 ^b	28,67±0,00 ^c	9,00±0,00 ^c	10,50±0,50 ^b
R11	83,06±0,02 ^b	29,56±0,01 ^a	7,33±1,15 ^d	9,00±1,73 ^b
R16	85,07±0,01 ^b	37,50±0,00 ^a	17,67±1,15 ^a	13,50±2,00 ^a
R17	77,77±0,02 ^b	25,39±0,01 ^c	7,00±0,00 ^d	11,50±0,500 ^a
R18	74,46±0,03 ^a	28,52±0,00 ^d	10,00±0,00 ^c	11,00±1,00 ^a

*Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

6. Cinética de Crescimento e Viabilidade celular

As cepas possivelmente probióticas testadas apresentaram variabilidade fenotípica pra os caracteres velocidade de crescimento, tempo de duplicação e contagem de células bacterianas viáveis (Tabela 4). A cepa bacteriana que apresentou maior velocidade de crescimento e menor tempo de duplicação ($p < 0,05$) foi a R16. As maiores concentrações de células bacterianas viáveis ($p < 0,05$) após 24 h de crescimento foram observadas nas cepas R1, R2, R4 e R16.

7. Teste de Mahalanobis (D2) e Caracterização bioquímica

Segundo a distância ao ideótipo calculada por Mahalanobis, a cepa bacteriana que mais se aproxima da cepa idealizada, com base nos melhores resultados de cada teste realizado foi a R16 (Tabela 5). Sendo assim, essa cepa foi identificada fenotipicamente pelo perfil bioquímico expresso ao degradar alguns açúcares dos 50 testados pelo kit API 50CHL como *Lactobacillus plantarum* com 99,9% de confiabilidade (ANEXO I).

Tabela 4: Velocidade máxima de crescimento bacteriano das cepas selecionadas do trato intestinal de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* adultas e assintomáticas, tempo de duplicação e contagem total após 24h de crescimento bacteriano*.

Cepas	Velocidade de Crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)	Tempo de duplicação	Contagem de células bacterianas viáveis após 24h (Log)
R1	0,13±0,00 ^c	5,58±0,14 ^b	9,39±0,08 ^a
R2	0,10±0,00 ^g	77,26±0,52 ^g	9,38±0,31 ^a
R4	0,01±0,00 ^g	46,08±0,24 ^f	9,70±0,35 ^a
R5	0,05±0,00 ^d	13,32±0,12 ^c	9,11±0,12 ^b
R6	0,03±0,00 ^f	27,42±0,03 ^e	9,00±0,04 ^b
R11	0,18±0,00 ^b	3,94±0,05 ^a	9,21±0,17 ^b
R16	0,20±0,00 ^a	3,46±0,00 ^a	9,36±0,04 ^a
R17	0,04±0,00 ^e	17,18±0,12 ^d	8,97±0,19 ^b
R18	0,01±0,00 ^g	113,53±1,24 ^h	9,11±0,32 ^b

*Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 5: Classificação das cepas selecionadas do trato intestinal de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* adultas e assintomáticas segundo a distância ao ideótipo criado pelo teste de Mahalanobis ao nível de significância de 5%.

Genótipos	Distância ao ideótipo	Classificação
R16	1.057,60	1°
R11	70.099,84	2°
R5	82.060,37	3°
R6	88.479,79	4°
R18	119.610,87	5°
R1	125.512,46	6°
R2	267.405,05	7°
R17	411.391,42	8°
R4	523.760,60	9°

Discussão

Existe uma crescente busca por bactérias autóctones probióticas espécie-específica, uma vez que em tese, estes micro-organismos teriam maior capacidade de colonizar o trato intestinal, se manter viáveis e trazer benefícios ao hospedeiro (Silva *et al.*, 2005). Entretanto, muitas das bactérias empregadas como probióticas para rãs *L. catenellus* são probióticos comerciais, bactérias isoladas de outros animais (Dias *et al.* 2008; Dias *et al.* 2010).

Dentre a gama de gêneros de bactérias utilizadas como probióticas na aquicultura pode-se destacar o *Bacillus* (Dias *et al.* 2008; França *et al.* 2008; Dias *et al.* 2010) e o grupo das ácido-láticas (Jatobá *et al.* 2008; Souza *et al.* 2010; Vieira *et al.* 2013). Estas são frequentemente utilizadas como probiótico principalmente por integrarem a microbiota natural de espécies aquáticas (Hagi *et al.* 2004), apresentarem facilidade de multiplicação e manutenção de sua concentração na microbiota intestinal, estimularem a resposta imune inata ou natural, produzirem compostos antimicrobianos e por não apresentarem grandes riscos de patogenicidade (Ringo e Gatesoupe 1998; Nayak 2010; Ringo *et al.* 2010; Nayak e Mukherjee 2011). São amplamente utilizadas na aquicultura tanto na piscicultura continental e marinha, quanto na carcinicultura (Gatesoupe 2002; Jatobá *et al.* 2008; Ringo *et al.*, 2010; Souza *et al.* 2010; Vieira *et al.* 2013).

As bactérias ácido-láticas apresentam uma série de características, dentre elas: serem Gram positivas, imóveis, não esporuladas, morfologia de cocos e bacilos, carência de citocromos e a ausência da enzima catalase (Ramírez *et al.* 2006). Esta enzima tem função antioxidante e atua na transformação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produto tóxico decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigênio atmosférico, em oxigênio. Como as bactérias láticas não apresentam esta enzima, quando sua colônia é exposta ao H_2O_2 não há a formação de microbolhas, pois o H_2O_2 é acumulado nos produtos fermentados (Mangoni *et al.* 2011; Poffo e Silva 2011; Li *et al.* 2012). Por este motivo, as cepas R3 e R17.1 foram descartadas durante a triagem.

Outro critério para a seleção de bactérias ácido-láticas potencialmente probióticas é a inibição de patógenos *in vitro*, pois é possível avaliar o potencial dessas cepas probióticas de inibir o crescimento de diferentes patógenos, que poderão causar danos aos animais de cultivo (Vine *et al.* 2004). Neste contexto, as cepas R2, R1 e R17 apresentaram os melhores halos de inibição frente às *Aeromonas*

hydrophila testadas. Esta espécie, *A. hydrophila*, já foi diagnosticada como uma das causadoras da síndrome da perna vermelha em girinos de rã-touro na metamorfose (Mouriño *et al.*, 2006). Esta doença é caracterizada pela hemorragia nos dedos, mandíbulas e pele, ulcerações nas patas e em girinos, causa hemorragia e ulcerações principalmente na cauda e pernas emergentes (Souza Junior e Hipolito, 2001; Mouriño *et al.*, 2006). Os melhores halos de antagonismo exibidos pelas cepas R2, R1 e R17 podem estar relacionado à quantidade de ácidos orgânicos, como o ácido acético e lático produzido por elas. Pois, segundo alguns autores, o potencial inibitório do grupo das bactérias ácido-láticas deve-se principalmente a estes compostos e as bacteriocinas (Vázquez *et al.* 2005; Merrifield e Ringo 2014).

Resultados semelhantes ao do presente trabalho, de inibição *in vitro* a patógenos são relatados em diversos organismos aquáticos, com diferentes bactérias potencialmente probióticas, como: *Lactobacillus plantarum* isolado e selecionado de *Litopenaeus vannamei* (Vieira *et al.* 2013), *L. plantarum* e *Lactococcus* sp isolados de juvenis de *Centropomus parallelus* (Souza *et al.* 2010), *L. plantarum* isolados de tilápia do Nilo (Jatoba *et al.* 2008), *Lactobacillus* sp. isolado de salmão (Balcazar *et al.* 2007; Balcazar *et al.* 2008) e *Weissella cibaria* isolada de *Pseudoplatystoma* sp (Mouriño *et al.* 2012).

As bactérias ácido-láticas apresentam inibição a patógenos tanto Gram positivo quanto Gram negativo, como evidenciado no presente estudo e nos trabalhos supracitados. Isto se deve a produção de inúmeros compostos antimicrobianos como as bacteriocinas, que agem principalmente contra bactérias Gram positivas, peróxidos de hidrogênio e ácidos orgânicos, que atuam predominantemente contra as bactérias Gram negativa (Roissart e Luquet 1994; Vázquez *et al.* 2005). Estas moléculas efetoras estão presentes nos produtos extracelulares, onde sua mínima concentração pode ser utilizada como critério de seleção à probióticas.

Nos resultados da mínima concentração inibitória (MIC) dos produtos extracelulares ficou evidente que a cepa R16 *L. plantarum* apresentou compostos inibitórios mais eficazes e com maior diluição quando comparada às demais cepas avaliadas frente à inibição dos patógenos testados (ATCC 7966 e a CPQBA 228-08 DRM). Entretanto, não se sabe se esta atividade inibitória do sobrenadante celular é decorrente dos ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou bacteriocinas, pois neste trabalho não se realizou a neutralização do pH durante o teste da MIC. Diferentemente, o estudo realizado por Mendoza *et al.* (2012) o sobrenadante foi neutralizado e algumas das

cepas ácido-láticas isoladas e selecionadas da cloaca, da pele dorsal e ventral de *L. catesbeianus* não apresentaram atividade antimicrobiana (*Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus gallinarum*), indicando que a principal resposta frente aos patógenos foi através do efeito dos ácidos orgânicos. Entretanto, estes autores, observaram que a cepa *Enterococcus* spp. continuou apresentando atividade inibitória mesmo com a neutralização do sobrenadante, apontando que sua atividade antimicrobiana está mais relacionada a produção H_2O_2 e/ou bacteriocinas.

Os sais biliares são metabólitos finais do colesterol, moléculas anfipáticas, liberadas no lúmen do intestino. Estes sais promovem a emulsificação de gordura, que facilita a digestão e/ou absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis, aumentam e/ou melhoram a absorção de proteínas da dieta pela clivagem proteolítica (Hofmann e Hagey 2008). Os sais biliares podem também exercer atividade antimicrobiana potente, devido ao seu efeito detergente (Hofmann e Hagey 2008; Hagey *et al.* 2010). As maiorias das cepas examinadas no presente estudo apresentaram grande perda de viabilidade celular na presença dos sais biliares. Entretanto, as cepas bacterianas R1, R4, R5 e R6 apresentaram tolerância superior às demais cepas selecionadas. Isso pode estar relacionado com a capacidade de alguns micro-organismos produzirem enzimas capazes de hidrolisar sais biliares. Já há registros de identificação, caracterização e detecção de inúmeras hidrolases de sais biliares em diversas bactérias como *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (Begley *et al.* 2006).

O crescimento microbiano é decorrente da fermentação dos nutrientes presentes no meio em que as bactérias se encontram. Para isto, as bactérias produzem inúmeras enzimas, como os ácido-lático e acético, que ao serem lançados ao meio externo podem levar a redução do pH do meio (Rózycki 1984; Vandenberghe *et al.* 1999; Litzinger *et al.* 2010; Li *et al.* 2012; Zanette *et al.* 2013). Talvez por esta razão as cepas R2, R4, R5, R11 e R16 apresentaram maior capacidade de reduzir o pH em relação aos demais micro-organismo avaliados. A R17 exibiu a menor redução do pH dentre as cepas selecionada, talvez por não produzir muitas moléculas de ácidos orgânicos e acetatos, e sim mais bacteriocinas.

Os ácidos orgânicos também podem atuar na inibição de patógenos e/ou na degradação de alguns nutrientes da dieta que não tenham sido bem aproveitados em etapas anteriores da digestão (Lückstädts 2008). Tal fato corrobora os resultados deste trabalho, onde

a cepa *L. plantarum* (R16) apresentou maior redução do pH, possivelmente pela elevada produção de ácidos orgânicos. Adicionalmente, apresentou maior halo de degradação do soro de leite em relação às demais cepas selecionadas, o que pode ser explicado pela maior produção de proteases. Semelhante ao presente estudo, Taheri *et al.* (2009) observaram halo de produção de protease em torno de 14,3 mm produzido pelo *Lactobacillus crispatus* isolado de aves. A elevada produção desta enzima, observada neste estudo, pode auxiliar na absorção de proteínas da dieta no trato intestinal do hospedeiro.

Existe uma grande gama de antibióticos no mercado (Pilarski e Schocken-Iturrino 2010; Gastalho *et al.* 2014). Dentre os antimicrobianos a tetraciclina possui diversas propriedades como: amplo espectro de ação (age contra bactérias Gram positiva ou negativa, anaeróbias ou aeróbias), baixo custo e baixa toxicidade (Pereira-Maia *et al.* 2010). As cepas que apresentaram maiores halos, consequentemente maior sensibilidade a este antimicrobiano foram a R1, R2, R5, R16, R17. Entretanto, foi observada resistência das cepas R6 e R11 à tetraciclina, revelando que estes micro-organismos podem possuir genes de resistência a este antimicrobiano, os quais podem ser transferidos as demais bactérias, tornando o tratamento ineficaz. Na ranicultura, já há registros de resistência bacteriana frente a alguns antimicrobianos, como: cefalotina, oxacilina e penicilina (Pilarski e Schocken-Iturrino 2010).

Outras características importantes de uma cepa probiótica são: a velocidade de crescimento e o tempo de duplicação. Quanto maior a velocidade e menor o tempo de duplicação, mais eficiente pode ser os processos de sua produção em escala comercial e maior o potencial competitivo *in vivo* desta dada bactéria (Vine *et al.* 2004). Fato evidenciado no presente estudo, onde a bactéria R16 (*L. plantarum*) apresentou os melhores desempenhos em velocidade máxima de crescimento, tempo de duplicação e viabilidade celular, quando comparada as demais cepas selecionadas. Já em comparação ao trabalho realizado por Vine *et al.* (2004), a R16 mostrou, também, velocidade de crescimento superior, maior contagem final de células viáveis e menor tempo de duplicação em relação às cepas com potencial probióticos para aquicultura isoladas por estes autores. Com relação ao estudo de seleção *in vitro* de bactérias com potenciais probióticos para camarões, executado por Vieira *et al.* (2013), a velocidade máxima e tempo de duplicação encontrado para a melhor cepa nesse quesito (*L. plantarum*) foram 0.15 ± 0.01 e 4.56 ± 0.38 , respectivamente. Sendo que esta

velocidade máxima é menor e o tempo de duplicação é maior que os encontrados no presente trabalho, para a R16.

Para comparar todos os caracteres avaliados e selecionar a cepa com o melhor desempenho frente a todos os testes *in vitro*, foi utilizada a análise multivariada baseada na distância de Mahalanobis (D^2), a qual correlaciona as variáveis de cada cepa com as variáveis do ideótipo. Dessa forma, selecionou-se a cepa ideal (ideótipo) com base nos melhores resultados de cada análise, afim de, estimar a menor distância de cada cepa ao ideótipo proposto (Mahalanobis 1936). Esta análise é mais recomendada para ensaios com este tipo de delineamento experimental (Cruz *et al.* 2004).

Com base nos caracteres expostos, a cepa bacteriana ideal que apresentou melhores resultados na maioria dos caracteres avaliados e consequentemente menor distância ao ideótipo, por Mahalanobis (D^2), foi a *Lactobacillus plantarum* (R16). Estes resultados confirmam, que dentre as cepas bacterianas avaliadas, a bactéria *L. plantarum* apresentou o melhor potencial para ser utilizada como probiótico na ranicultura. Entretanto, outros estudos visando à suplementação deste micro-organismo em dietas comerciais para *L. catsebeianus* devem ser realizados, a fim de, elucidar melhor seus potenciais efeitos probióticos *in vivo*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo a S.A. Pereira, à Ranac Agroindustrial Ltda, pelo fornecimento dos animais para o estudo e a Eduardo Alano Vieira pelo apoio nas análises estatísticas.

Referências

- Afonso, A.M. (2012) Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. *Visão Agrícola* **11**, 33-35.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Girones, O. e Muzquiz, J.L. (2007) In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Vet Microbiol* **122**, 373-380.

- Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. e Girones, O. (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* **278**, 188-191.
- Begley, M., Hill, C. e Gahan, C.G.M. (2006) Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microb* **72**, 1729-1738.
- Cabello, F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* **8**, 1137-1144.
- Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P. e Benno, Y. (1999) Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol* **45**, 177-184.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition* **33**, 7.
- Condon, S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *Microbiol Lett* **46**, 269-280.
- Cruz, C.D. (1998) Programa GENES: Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). *Genet Mol Biol* **21**.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J. e Carneiro, P. C. S. (2004) Modelo biométricos aplicado ao melhoramento genético. *Viçosa: UFV*, **1**, 5, 0-171.
- Dias, D., Stéfani, M., Ferreira, C. e França, F. (2008) Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. *Arch zootec*, 449-455.
- Dias, D.D., De Stefani, M.V., Ferreira, C.M., Franca, F.M., Ranzani-Paiva, M.J.T. e Santos, A.A. (2010) Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquac Res* **41**, 1064-1071.

FAO (2015) World aquaculture production by species groups. <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/b-1.pdf>. Acesso em 25/02/2015.

Feix, R.D., Abdallah, P.R. e Figueiredo, M.R.C. (2006) Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. *Inf Econômica* **36**, 3, 70-80.

França, F.M., Dias, D.d.C., Teixeira, P.C., Marcantonio, A.S., de Stefani, M.V., Antonucci, A., da Rocha, G., Tavares Ranzani-Paiva, M.J. e Ferreira, C.M. (2008) Effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on growing, survival and fisiology in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Bol Inst Pesca* **34**, 403-412.

Gastalho, S., da Silva, G. e Ramos, F. (2014) Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. *Acta Farm Port* **3**, 29-45.

Gatesoupe, F.J. (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Microb Biotech* **14**, 107-114.

Gatesoupe, F.J. (2002) Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* **212**, 347– 360.

Grenard, S. (2007) *Frogs and Toads: Your Happy Healthy Pet*: John Wiley & Sons.

Hagey, L.R., Moller, P.R., Hofmann, A.F.e Krasowski, M.D. (2010) Diversity of Bile Salts in Fish and Amphibians: Evolution of a Complex Biochemical Pathway. *Physiol Biochem Zool: PBZ* **83**, 308-321.

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. e Hoshino, T. (2004) Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* **234**, 335-346.

Hofmann, A.F. e Hagey, L.R. (2008) Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2461-2483.

Jatobá, A., Vieira, F.D., Neto, C.B., Silva, B.C., Mourino, J.L.P., Jeronimo, G.T., Dotta, G. e Martins, M.L. (2008) Lactic-acid bacteria

isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesq Agropec Bras* **43**, 1201-1207.

Li, H.P., Yeager, C.M., Brinkmeyer, R., Zhang, S., Ho, Y.F., Xu, C., Jones, W.L., Schwehr, K.A., Ootosaka, S., Roberts, K.A., Kaplan, D.I. e Santschi, P.H. (2012) Bacterial production of organic acids enhances H₂O₂ dependent iodide oxidation. *Environ Sci Technol* **46**, 4837-4844.

Litzinger, S., Fischer, S., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. e Mayer, C. (2010) Structural and Kinetic Analysis of *Bacillus subtilis* N-Acetylglucosaminidase Reveals a Unique Asp-His Dyad Mechanism. *J Biol Chem* **285**, 35675-35684.

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

Mahalanobis, P C. (1936). On the generalised distância in statistics. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India*, **2** (1), 49–55.

Mangoni, J., dos Santos Pozza, M.S., Sabedot, M.A., Pozza, P.C., de Almeida, S. e Heinzen, E.L. (2011) Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína. *Acta Sci. Anim. Sci* **33**, 267-272.

Mendoza, G.M., Pasteris, S.E., Ale, C.E., Otero, M.C., Buhler, M.I. e Nader-Macias, M.E.F. (2012) Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. *Res Vet Sci* **93**, 1160-1167.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex, M. e Ringo, E. (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* **302**, 1-18.

Merrifield, D.L. e Ringo, E. (2014) *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 1- 488.

Moreira, C.R., Henriques, M.B. e Ferreira, C.M. (2013) Frog Farms as Proposed in Agribusiness Aquaculture: Economic Viability Based in Feed Conversion. *Bol Inst Pesca* **39**, 389-399.

Mouriño, J.L.P., Do Nascimento Vieira, F., Jatobá, A.B., Da Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q. e Martins, M.L. (2012) Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquacult Nutr* **18**, 73-80.

Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., Yamashita, M.M., Batista, C.R.V. e Pereira, M.A. (2006) Isolation of *Aeromonas hydrophila* in bullfrog tadpoles in the transformant stage. *Pesq Agropec Bras* **41**, 1325-1327.

Nayak, S. K. (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res* **41**, 11, 1553-1573.

Nayak, S. K. e Mukherjee, S. C. (2011) Screening of gastrointestinal bacteria of Indian major carps for a candidate probiotic species for aquaculture practices. *Aquac Res*, **42**, 7, 1034-1041.

Nobrega, I.C.C., Ataíde, C.S., Moura, O.M., Livera, A.V. e Menezes, P.H. (2007) Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. *Food Chem* **102**, 186-191.

Pasteris, S.E., Guidoli, M.G., Otero, M.C., Bühler, M.I. e Nader-Macías, M.E. (2011) *In vitro* inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. *Vet Microbiol* **151**, 336-344.

Pereira-Maia, E.C., Silva, P.P., Almeida, W.d., Santos, H.d., Marcial, B.L., Ruggiero, R. e Guerra, W. (2010) Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. *Quim Nova* **33**, 700-706.

Pilarski, F. e Schocken-Iturrino, R. (2010) Isolation and antimicrobial resistance of *Streptococcus* spp. strains from bullfrog (*Lithobates catesbeiana*). *Arq Bras Med Vet Zoo* **62**, 5, 1275-1279.

Pires, C.V., Oliveira, M.G.d.A., Rosa, J.C. e Costa, N.M.B. (2006) Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. *Food Sci Technol* (Campinas) **26**, 179-187.

Poffo, F. e Silva, M. (2011) Taxonomic and physiological characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *Ciênc Tecnol Aliment* **31**, 303-307.

Ramírez, C., Cifonni, E.M.G., Pancheniak, E.F.R. e Soccol, C.R. Microorganismos lácticos con características probióticas para ser aplicados en La alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. *Aliment Latinoam* **264**, 70-78.

Ringo, E. e Gatesoupe, F.J. (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* **160**, 177-203.

Ringo, E., Olsen, R.E., Mayhew, T.M. e Myklebust, R. (2003) Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* **227**, 395-415.

Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Bakker, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R. E. e Mathew, T. M. (2010) Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac Res* **41**, 4, 451-467.

Roissart, H.d. e Luquet, F. (1994) Bactéries Lactiques Aspects fondamentaux et technologiques. *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*: Loriga **1**.

Rózycki, H. (1984) Production of organic acids by bacteria isolated from soil, rhizosphere e mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Acta Microbiol Pol* **34**, 301-308.

Silva, F. C. P., Brito, M. F. G., Farias, L. M. e Nicoli, J. R. (2005) Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J Fish Biol* **67**, 1686 – 1698.

Souza junior, F. L.; Hipolito, M. Manejo sanitário de criação de rãs. In: Encontro Nacional de Ranicultura, 11., 2001, Bragança Paulista, SP. Anais. Bragança Paulista: Abetra, 2001. p. 1-34.

Souza, R. M., Mouriño, J. L., Vieira, F.N., Buglione, C. C., Andreatta, E. R., Seiffert, W. Q. e Cerqueira, V. R. (2010) Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus* poey, 1860). *Bol. Inst. Pesca* **36**, 17 – 24.

Taheri, H., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M. e Shivazad, M. (2009) Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry science* **88**, 1586-1593.

Vandenbergh, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A. e Lebeault, J.-M. (1999) Microbial production of citric acid. *Braz Arch Biol Technol* **42**, 263-276.

Vázquez, J.A., González, M.P. e Murado, M.A. (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* **245**, 149-161.

Vieira, F.D., Jatoba, A., Mourino, J.L.P., Vieira, E.A., Soares, M., da Silva, B.C., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. e Vinatea, L.A. (2013) *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesqui Agropecu Bras* **48**, 998-1004.

Vine, N.G., Leukes, W.D. e Kaiser, H. (2004) *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *Fems Microbiol Lett* **231**, 145-152.

Zanette, R.A., Ferreiro, L., Alves, S.H., Jesus, F.P.K., Lautert, C., Spanemberg, A. e Santurio, J.M. (2013) Enzymatic variability among Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. *Rev Iberoam Micol* **30**, 264-266.

CAPÍTULO 3

Potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* autóctone na dieta de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)

Scheila Anelise Pereira¹, Gabriela Tomas Jerônimo¹, Natália da Costa Marchiori², Hugo Mendes de Oliveira¹, Marco Shizo Owatari¹, Maurício Laterça Martins¹, José Luiz Pereira Mouriño¹

¹Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil.

²Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI), Rua José Francisco Vitor 40, 88332-230, Camboriú, SC, Brasil
Autor para correspondência: schepereira@gmail.com

“Running title”: *Lactobacillus plantarum* probiotic of tadpole.

Abstract

Dietary supplementation with probiotics in animal production is being consolidated as an alternative measure to antibiotics, which can lead to economic, health and environmental problems when used improperly. The frog culture, studies involving indigenous strains of bacteria with probiotic potential and their effects on the performance and on the intestinal histological characteristics of farmed animals are scarce. The aim of this study was to evaluate the potential of probiotic *Lactobacillus plantarum* indigenous supplemented in tadpoles bullfrog *Lithobates catesbeianus* diet. The test was conducted completely randomized in two treatments with nine replications, considered: without supplementation group and group supplemented with *L. plantarum*. Finally, we evaluated the following factors: growth performance, *L. plantarum* capacity to produce enzymes digestive, feed and colonize the intestinal tract and characterization of the intestinal tract histology of the analyzed specimens. Animals fed diet supplemented with *L. plantarum* showed greater weight gain, bacteria concentration lactic acid in the gut and lower feed conversion. There was no significant difference in survival, total heterotrophic bacterial count and histological changes in gut between treatments. The *L. plantarum* strain was able to colonize the intestinal tract feed and *L. catesbeianus*, staying at high concentration

(10^7 e 10^6 UFC·g⁻¹, respectively), in addition to producing various enzymes, which may have contributed to the greater weight gain and lower feed conversion in the supplemented group. The strain *L. plantarum* has the potential probiotic for tadpoles of bullfrogs.

Keywords: Frog culture, gut histology, melanomacrophage, enzyme production, weight gain, lactic acid bacteria.

Resumo

A suplementação dietética com probióticos na produção animal vem se consolidando como medida alternativa ao uso de antibióticos, os quais podem ocasionar problemas econômicos, sanitários e ambientais quando utilizados de forma indevida. Na ranicultura, estudos envolvendo cepas de bactérias autóctones com potencial probiótico e seus efeitos sobre o desempenho zootécnico e sobre as características histológicas intestinais do animal cultivado são escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* autóctone, suplementada na dieta de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus*. O ensaio foi realizado inteiramente ao acaso em dois tratamentos com nove repetições, considerados: grupo sem suplementação e grupo suplementado com *L. plantarum*. Ao final, foram avaliados os seguintes fatores: desempenho zootécnico, capacidade de *L. plantarum* para produzir enzimas digestivas, colonizar a ração e o trato intestinal e caracterização da histologia do trato intestinal dos espécimes analisados. Os animais que receberam dieta suplementada com *L. plantarum* apresentaram maior ganho de peso, concentração de bactéria ácido-lática no intestino e menor conversão alimentar. Não foi verificada diferença significativa na sobrevivência, contagem de bactérias heterotróficas totais e alterações histológicas no intestino entre os tratamentos. A cepa *L. plantarum* foi capaz de colonizar a ração e o trato intestinal dos girinos de *L. catesbeianus*, mantendo-se em alta concentração (10^7 e 10^6 UFC·g⁻¹, respectivamente), além de produzir diversas enzimas digestivas, que podem ter contribuído para o maior ganho de peso e menor conversão alimentar no grupo suplementado. A cepa *L. plantarum* apresentou potencial probiótico para girinos de rã-touro.

Palavras chaves: Ranicultura, histologia intestinal, melanomacrófago, produção enzimática, ganho de peso, bactéria ácido-lática.

Introdução

A criação de rãs em cativeiro para fins comerciais é uma alternativa de empreendimento agroindustrial que se desenvolveu nas últimas décadas devido ao avanço tecnológico e ao aperfeiçoamento das instalações e técnicas de manejo utilizadas no cultivo (Cribb, Afonso & Ferreira 2013; Moreira, Henriques & Ferreira 2013). A rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), espécie exótica originária da América do Norte é, atualmente, a principal espécie cultivada no país devido às suas excelentes características zootécnicas e boa adaptação às condições climáticas brasileiras (Afonso 2012; FAO 2014; Moreira *et al.* 2013).

Devido a este fato, maior atenção tem sido dada aos aspectos sanitários associados a atividade, resultando no aumento de informações acerca das enfermidades. Entre estas, as de origem bacteriana podem ser consideradas as de maior importância sanitária, na medida em que são ubíquas, possuem caráter oportunista e potencial para ocasionar grandes perdas econômicas devido aos altos índices de mortalidade frequentemente associados (Feix, Abdallah & Figueiredo 2006; Mouriño, Martins, Yamashita, Batista & Pereira 2006; Grenard 2007; Pasteris, Guidoli, Otero, Buhler & Nader-Macias 2011).

Durante os últimos anos, os antibióticos têm sido amplamente empregados na produção animal como agentes terapêuticos para tratar essas enfermidades. Contudo, o uso indiscriminado e recorrente deste quimioterápico acabou colocando-o sob vigilância devido à crescente preocupação com o desenvolvimento de resistência bacteriana, indução de resistência cruzada por bactérias patogênicas, presença de seus resíduos na carne animal tratada e poluição ambiental (Cabello, 2006), entre outras.

Como alternativa ao uso de antibióticos, há destaque para os probióticos que são micro-organismos que colonizam o trato intestinal dos animais, inibem o crescimento de bactérias patogênicas, promovem melhorias zootécnicas, entre outras vantagens (Balcázar, Blas, Ruiz-Zarzuela, Cunningham, Vendrell & Múzquiz 2006). Neste sentido, existe uma aceitação crescente quanto ao uso de dietas suplementadas com probióticos e seu efeito benéfico sobre a microbiota intestinal do animal cultivado, tornando-se importante ferramenta para reduzir a ocorrência de patógenos e melhorar o crescimento dos animais (Suzer, Çoban, Kamaci, Saka, Firat, Otgucuoğlu & Küçüksari 2008).

Dentre os probióticos empregados no cultivo de rã, os mais comuns são os de origem comercial, isto é, micro-organismos não

inerentes à flora intestinal do animal em questão (França, Dias, Teixeira, Marcantonio, De Stéfani, Antonucci, Da Rocha, Tavares-Ranzoni & Ferreira 2008; Dias, De Stéfani & Ferreira 2008; Dias, De Stéfani, Ferreira, França, Ranzani-Paiva & Santos 2010). No entanto, este produto comercial probiótico pode não atingir quantidades suficientes de colonização no trato gastrointestinal e, por conseguinte, não apresentar boa regularidade em seus efeitos benéficos (Nayak, 2010). Probióticos autóctones espécie-específico vem sendo utilizados alternativamente a estes produtos, e tem se mostrado eficiente na colonização de rações e trato intestinal, melhorando o desempenho zootécnico e hemato-imunológico de animais na aquicultura como observado por Jatobá, Vieira, Neto, Silva, Mouriño, Jerônimo, Dotta & Martins (2008), Merrifield Bradley, Baker & Davies (2010a), Merrifield, Dimitroglou, Foey, Davies, Baker, Bogwald, Castex & Ringo (2010b), Jatobá, Vieira, Buglione, Mouriño, Silva, Seiffter & Andreatta (2011), Mouriño, Vieira, Jatobá, Da Silva, Jesus, Seiffert & Martins (2012), Mendoza, Pasteris, Ale, Otero, Buhler & Nader-Macias (2012).

Entretanto, estudos relacionando à suplementação dietética de probióticos autóctones para rãs são escassos. Até o momento tem sido descrito apenas estudos de seleção de bactérias potencialmente probióticas e a caracterização de algumas moléculas produzidas por estes micro-organismos para *Lithobates catesbeianus* (Pasteris, Babot, Otero, Buhler & Nader-Macias 2009; Pasteris *et al.* 2011; Mendoza *et al.* 2012; Pasteris, Pingitore, Ale & Nader-Macias 2014). O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial probiótico da suplementação dietética da cepa *Lactobacillus plantarum* autóctone para girinos de rã-touro *L. catesbeianus*.

Materiais e Métodos

1. Material biológico e teste de produção enzimática

A cepa *Lactobacillus plantarum*, pertence ao grupo das bactérias ácido-láticas (BAL), foi isolada, selecionada do trato intestinal de rã-touro adulta em ensaios prévios (dados não publicados), identificada bioquimicamente com 99,9% de confiabilidade pelo kit API 50CHL (BioMérieux®) e mantida no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC), para posteriores ensaios. Esta cepa foi testada quanto à produção enzimática pelo kit comercial API-ZYM (BioMérieux®) seguindo a metodologia do

fabricante. Após a reação, a leitura dos resultados foi registrada na escala de 0 a 5, onde 0 corresponde a reação negativa e 5 a reação positiva de intensidade máxima.

2. Preparo das dietas experimentais e análise bromatológica

Para a realização da ração do grupo suplementado com *L. plantarum*, procedeu-se primeiramente o preparo do inóculo, repicando a cepa BAL em meio de cultura Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) (HIMEDIA®), a 35 °C por 24 h. A ração comercial foi aspergida com este inóculo na proporção de 100 mL·Kg⁻¹ de ração. A mistura foi incubada a 35 °C por 30 min em recipiente hermeticamente fechado. Após, este recipiente foi aberto e seco em estufa bacteriológica com recirculação de ar, a 30 °C por 12 h. A ração do grupo não suplementado foi aspergida apenas com meio de cultura MRS estéril nas mesmas proporções e condições. Este processo foi realizado semanalmente. Ambas as rações foram analisadas no Laboratório de Análise de Alimento da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAL/UFSC). As análises de carboidratos totais e valor energético foram realizadas pelo método RDC, nº 360 (Anvisa 2003), matéria fibrosa, matéria mineral, proteína, umidade e voláteis pela portaria nº 108 (MAPA 1991).

3. Contagem microbiológica da ração

Para avaliar a permanência da cepa *L. plantarum* na ração do grupo suplementado foi realizado contagem de bactérias ácido-láticas totais no início e ao final de cada semana. Para tal, 1 g da ração do grupos suplementado, foi macerado, acrescido de 1 ml de solução salina estéril 0,65% de NaCl e diluído serialmente oito vezes no fator 1:10. As concentrações presentes de bactérias ácido-láticas foram quantificadas semeando as diluições 10⁻⁴ a 10⁻⁸ em meio de cultura MRS com 1% de azul de anilina e incubadas a 35°C por 48 h. As concentrações presentes de micro-organismos foram aferidas em unidades formadoras de colônia por grama de ração (UFC·g⁻¹).

4. Delineamento experimental

Os girinos de *L. catesbeianus* foram oriundos de um cultivo comercial, localizado no município de Antônio Carlos, Santa Catarina, Brasil (27°31'0''S; 48°46'4''O) e encaminhados para o laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos da Universidade Federal

de Santa Catarina (UFSC). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da UFSC (PP00936 CEUA/UFSC).

Girinos de 0,1g com aproximadamente 15 dias de vida, estágio G2 ou 23 a 25 de Gosner (Gosner 1960), foram transportados em sacos plásticos de 30L com oxigênio injetado. Ao chegarem ao laboratório, os animais foram distribuídos nas unidades experimentais (UE), compostas por caixas de fibra de polietileno com capacidade de 30L. As caixas foram abastecidas com 25L, na densidade de um girino por litro, e os girinos aclimatados por seis dias até o início do ensaio, que teve duração total de 42 dias.

Os girinos foram separados em dois tratamentos, com nove repetições, totalizando 18 unidades experimentais. Os tratamentos consistiram em: ração comercial sem suplementação acrescida de MRS estéril, e ração comercial suplementada com *L. plantarum* e MRS. Os girinos foram alimentados com 12% da biomassa (Cribb et al. 2013), três vezes ao dia. O ajuste da quantidade de ração por UE era realizado semanalmente através da biometria.

As UEs estavam acopladas ao sistema de recirculação de água do tipo semi-aberto, com filtros mecânicos, biológicos (anaeróbio e aeróbio) e esterilização ultravioleta. A renovação era de aproximadamente 20% ao dia. O excesso de fezes era removido por sifonagem duas vezes ao dia. O fotoperíodo foi controlado 12L:12E (luz e escuro). Os parâmetros de qualidade de água, temperatura e oxigênio dissolvido, foram medidos diariamente com auxílio de multiparâmetro (HANNA® HI 9828 USA). O pH, amônia, nitrito e alcalinidade foram medidos na água de abastecimento todos os dias pelo Kit Compacto Acqua Análises®.

5. Índices zootécnicos

Foram determinadas as taxas de sobrevivência, ganho de peso (g) e conversão alimentar (C.A) por tratamento, pelas seguintes equações:

A. Sobrevivência (S)

$$S = \frac{N^{\circ} \text{ final de girinos} \cdot UE^{-1} \times 100}{N^{\circ} \text{ inicial de girinos} \cdot UE^{-1}}$$

B. Ganho de peso total (G.P.T)

Ganho de peso total = biomassa total final (g) - biomassa total inicial (g)

C. Conversão alimentar (C.A)

$$C.A = \frac{\text{consumo de ração(g)}}{\text{ganho de peso total (g)}}$$

6. Contagem microbiológica do trato gastrointestinal

Ao final do experimento, o intestino de cinco animais por UE foram extirpados assepticamente, pesados, macerados e diluídos serialmente na proporção de 1:10 e posteriormente as diluições de 10^{-4} a 10^{-9} foram semeados em meio de MRS com azul de anilina e em Ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia®) para a quantificação de bactérias ácido-láticas totais e bactérias heterófitas totais, nos respectivos meios de cultura.

7. Análise histológica

O intestino de dois girinos por UE foram retirados, e a porção média anterior foi fixada em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, técnicas histológicas de rotina foram realizadas, confeccionando cortes de $3\mu\text{m}$ (Humason 1979). As lâminas foram coradas pelo método de: a) Hematoxilina e Eosina (HE): para verificar a normalidade dos tecidos intestinais e quantificar melanomacrófagos e centros de melanomacrófagos (MMC); b) Tricrômio de Masson (TM): para averiguar as células de muco, identificação e quantificação de leucócitos granulares PAS-positivo (LG-PAS); c) Perl: para investigar a absorção de ferro férrico e a formação de hemossiderina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss primo star) e as fotografias confeccionadas no microscópio LEICA DM500 na câmera LEICA ICC50. Os resultados são apresentados em percentagem de alterações por porção de trato intestinal ($\% \cdot \text{trato intestinal}^{-1}$).

8. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar normalidade e homocedasticidade de variância, respectivamente. Estando os pressupostos garantidos, os dados foram submetidos ao teste T de Student ao nível de significância de 5%, com auxílio do software Statística 7.0. Quando necessário, os dados foram transformados em logaritmo de base 10. Os dados histológicos foram submetidos ao teste exato de Fischer ao nível de significância de 5%.

Resultados

1. Teste de produção enzimática

Das 19 enzimas digestivas identificadas pelo kit API-ZYM, a cepa *Lactobacillus plantarum* foi positiva para nove enzimas, são elas: leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase e N-acetil- β -glucosaminidase.

2. Análise bromatológica da ração

A análise físico-química das dietas apresentaram valores aproximados entre as rações suplementadas e não suplementadas utilizadas no ensaio (Tabela 1).

Tabela 1: Dados bromatológicos das rações comercial suplementada com *L. plantarum* e a ração do grupo não suplementado*.

Análise Físico-química da ração	Não suplementada	Suplementada
Carboidratos totais	48,54g·100 ⁻¹ g	48,73g·100 ⁻¹ g
Extrato etéreo	4,87g·100 ⁻¹ g	4,68g·100 ⁻¹ g
Matéria fibrosa (fibra bruta)	1,5g·100 ⁻¹ g	1,5g 100 ⁻¹ g
Matéria Mineral	5,92g·100 ⁻¹ g	6,09g·100 ⁻¹ g
Proteína	24,85g·100 ⁻¹ g	25,44g·100 ⁻¹ g
Umidade e voláteis	14,32g·100 ⁻¹ g	13,56g·100 ⁻¹ g
Valor calórico total	337,39kcal·100 ⁻¹ g ou 1427,82kJ·100 ⁻¹ g	338,80kcal 100 ⁻¹ g ou 1434,05kJ·100 ⁻¹ g

*Laudo em anexo I.

3. Contagem microbiológica da ração

A contagem de bactérias ácido-láticas na ração do grupo suplementado apresentou em média $2,63 \times 10^7$ UFC·g⁻¹ e $1,46 \times 10^7$ UFC·g⁻¹ de ração no início e ao final de cada semana, respectivamente.

4. Parâmetros de qualidade de água

Não houve diferença estatística quanto aos parâmetros de qualidade de água entre os grupos não suplementado e suplementado.

Dessa forma, a temperatura da água se manteve em torno de $25,30 \pm 0,45$ °C, o oxigênio dissolvido em $7,17 \pm 0,33$ mg·L⁻¹, o pH em $6,73 \pm 0,4$ e a alcalinidade em $19,54 \pm 5,66$ mg·L⁻¹ de CaCO₃. Amônia e nitrito estavam abaixo da concentração detectável pelo Kit Compacto Acqua Análises a considerar 0,6 e 0,1 mg·L⁻¹, respectivamente.

5. Índices Zootécnicos

O grupo suplementado com o *L. plantarum* apresentou melhores resultados em ganho de peso médio final e conversão alimentar em relação ao grupo não suplementado (Fig. 1 a e b). Com relação à porcentagem de sobrevivência, não houve diferença significativa (Fig. 1 c).

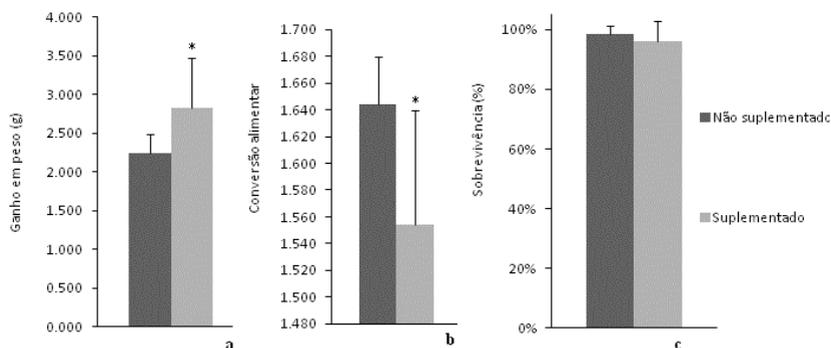


Figura 1 Desempenho zootécnico de girinos *Lithobates catesbeianus* alimentada com ração comercial suplementada com *L. plantarum* ou com ração não suplementada. **a)** Ganho de peso médio final. **b)** Conversão alimentar média. **c)** Porcentagem de sobrevivência. (*) indica diferenças significativas ($p < 0,05$).

6. Contagem microbiológica do trato gastrointestinal

A contagem de bactérias ácido-láticas por grama de intestino foi maior no grupo suplementado com *L. plantarum* em relação ao grupo não suplementado (Fig. 2 a). A concentração de bactérias heterotróficas totais não apresentou diferença significativa (Fig. 2 b).

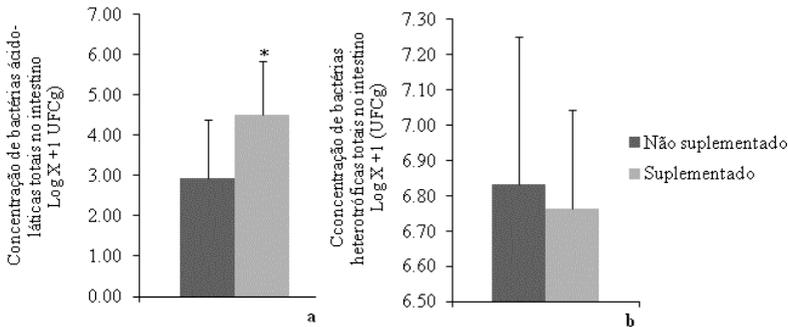


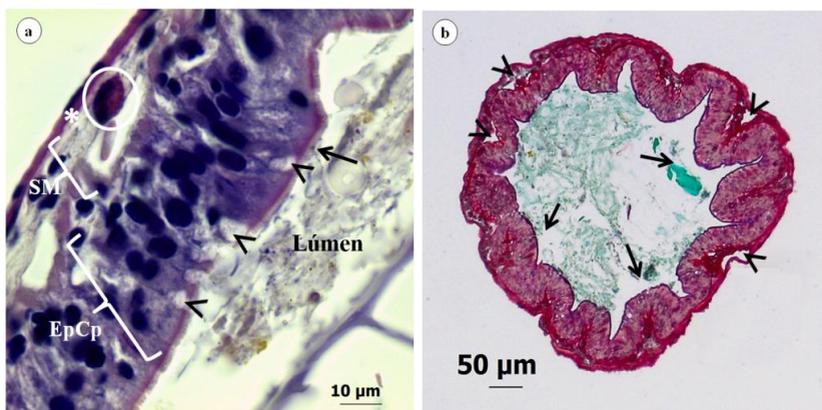
Figura 2 Concentração de bactérias no intestino de girinos *Lithobates catesbeianus* alimentados com ração comercial suplementada com probiótico *L. plantarum* ou com ração não suplementada. **a)** Contagem de bactérias ácido-láticas no trato intestinal. **b)** Contagem de bactérias heterotróficas totais no trato intestinal. (*) Indica diferenças significativas ($p < 0,05$).

7. Análise histológica

Não foi verificada diferenças estatísticas significativas na análise histológica da porção anterior do trato intestinal dos animais no estágio G3 ou 30-40 de Gosner (Gosner 1960) suplementados ou não com *L. plantarum* (Tabela 2). Entretanto, na grande maioria, independente do tratamento, o epitélio intestinal apresentou-se íntegro com células epiteliais simples, pseudo-estratificado com bordas em escova (microvilosidade) e células caliciformes; submucosa composta de fibras colágenas e vasos sanguíneos; membrana serosa apoiada sobre um fino tecido conjuntivo, que se apresentou extremamente frouxo. O início da formação de vilos foi verificado (Fig. 3 a e b). Melanomacrófagos e MMC foram observados e quantificados por porção intestinal avaliada (Fig. 4 b e d), e apresentaram-se em $150 \pm 8,52$ e $40 \pm 5,39$ para o grupo não suplementado e $238 \pm 12,03$ e $67 \pm 4,54$ para o grupo suplementado com *L. plantarum*, respectivamente. Os pontos de melanização estavam compactos, na periferia, próximo ao vaso sanguíneo e da membrana serosa (Fig. 4 c e d). Leucócitos granulares LG-PAS foram encontrados na sua grande maioria próxima a submucosa intestinal (Fig. 4 a e 5 b) e quantificados em $109 \pm 9,42$ e $132 \pm 9,75$ células LG-PAS por trato intestinal, nos respectivos tratamentos, não suplementado e

suplementado. A absorção de ferro férrico da ração pelas células epiteliais e o acúmulo de hemossiderina foram constatados em ambos os grupos (Fig. 6 a e b).

Figura 3 Corte histológico do intestino de girinos *Lithobates catesbeianus* no estágio G3. **a)** grupos não suplementado, corado em HE, membrana serosa (asterisco), leucócito granular (LG-PAS) (círculo), submucosa (SM), tecido epitelial pseudoestratificado (EpCp), microvilosidades (seta contínua) e células caliciformes (pontas de setas).



b) grupo suplementado com *L.plantarum*, corado em Tricrômio de Masson, início da formação dos vilos (setas contínuas) e tecido conjuntivo frouxo (cabeças de setas).

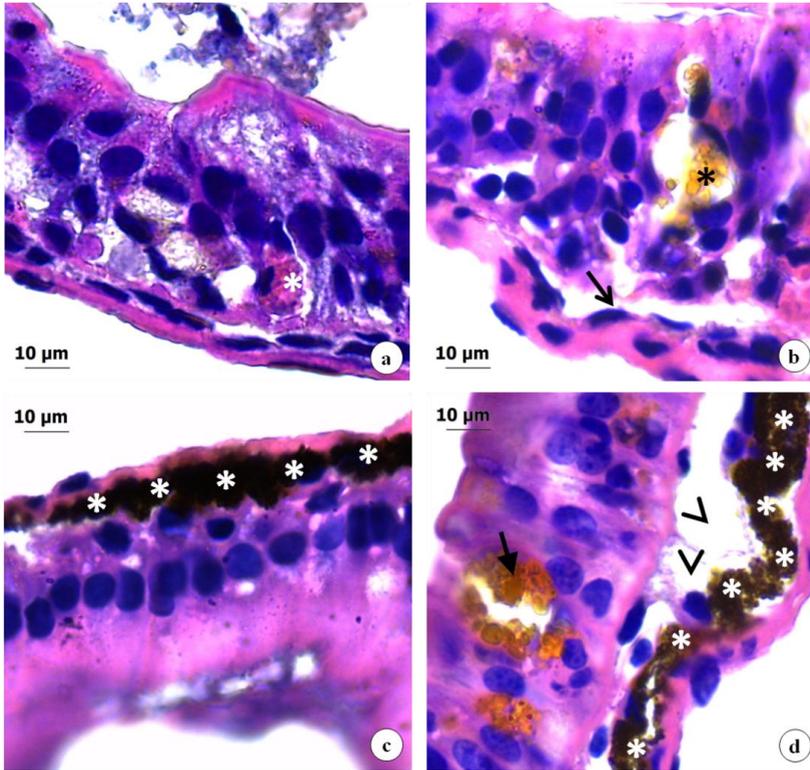


Figura 4 Corte histológico do intestino de girinos *Lithobates catesbeianus* no estágio G3 dos grupos não suplementado e suplementado com *L. plantarum*, corados com HE. **a**, **b** e **c** representam o grupo não suplementado, onde em **a**) leucócito granular (LG-PAS) (asterisco); **b**) centro de melanomacrófago (asterisco) e tecido conjuntivo frouxo (seta) **c**) pontos de melanização (asteriscos); **d**) representa o grupo suplementado, centro de melanomacrófago (seta contínua), pontos de melanização (asteriscos) e tecido conjuntivo frouxo (cabeças de setas).

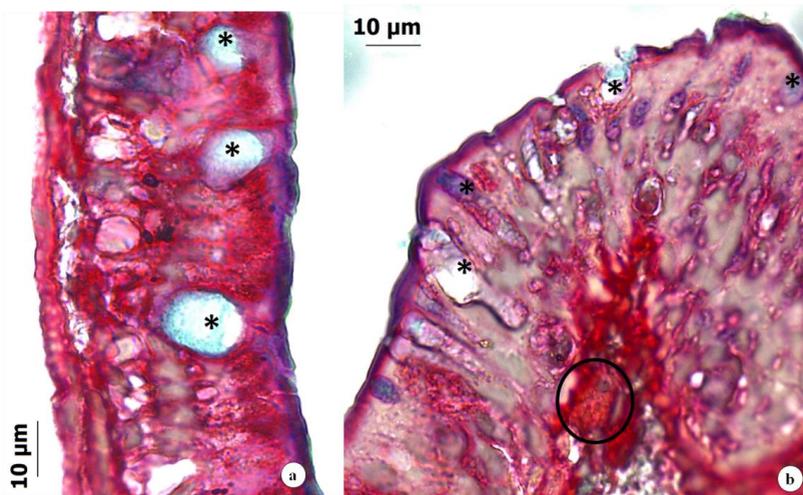


Figura 5 Corte histológico do intestino de girinos *Lithobates catesbeianus* no estágio G3 dos grupos não suplementado e suplementado com *L. plantarum* respectivamente **a** e **b**, corados com Tricrômio de Masson. **a)** células caliciformes (asteriscos); **b)** células caliciformes (asteriscos) e leucócito granular LG-PAS (círculo).

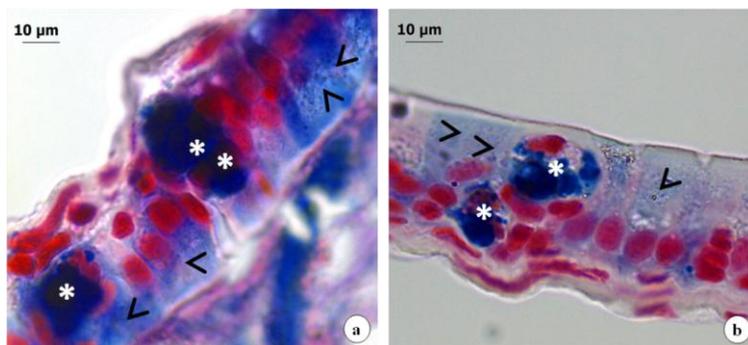


Figura 6 Corte histológico do intestino de girinos *Lithobates catesbeianus* no estágio G3 dos grupos não suplementado e suplementado com *L. plantarum* respectivamente **a** e **b**, corados com Perl. **a)** ferro férrico sendo absorvido pelas células epiteliais (cabeça de seta) e o acúmulo de hemossiderina dentro dos melanomacrófagos (asteriscos); **b)** ferro férrico sendo absorvido pelas células epiteliais (cabeça de seta) e o acúmulo de hemossiderina dentro dos melanomacrófagos (asteriscos).

Tabela 2: Alterações histológicas (%·trato intestinal⁻¹) da porção anterior do trato intestinal de girinos no estágio G3 não suplementados e suplementados com *L. plantarum*.

Alterações observadas (%·trato intestinal ⁻¹)	Não suplementado (%)	Suplementado (%)
Melanomacrófago	82	94
Centro de Melanomacrófago	47	59
Pontos de melanização	41	35
Absorção de Ferro da ração	53	71
Hemossiderina	82	100
LG-PAS	82	88
Vilos	65	59

Discussão

Os parâmetros de qualidade de água não influíram sobre os resultados, pois não houve diferença estatística entre os grupos. Entretanto, ficaram dentro dos padrões recomendáveis para o cultivo de girinos de rã-touro, pois, Cribb *et al.* (2013) recomendam que girinos devem estar em um ambiente com temperatura entre a faixa de tolerância de 21-25°C, pH entre 6,5-7,5, amônia menor ou igual a 0,5 mg·L⁻¹, entretanto já foi observada a concentração de 0,7 mg·L⁻¹ sem danos aparentes aos animais, nitrito desejável até 0,5 mg·L⁻¹ e oxigênio dissolvido maior ou igual a 4 mg·L⁻¹, não inferior a 1,5 mg·L⁻¹.

As análises físico-químicas das rações utilizadas no presente estudo demonstram que a suplementação de *L. plantarum* não altera o valor nutricional da dieta. Os dados de carboidrato, extrato etéreo, proteína e energia ficaram dentro dos padrões para o cultivo dessa espécie, portanto, não influíram sobre os resultados obtidos (Albinati, Lima & Donzele 2001; Seixas Filho, Gomes, Aguiar, Hipolito, Martins & Chaves 2008; Seixas Filho, Navarro, Pereira, Mello, Lanna & Lima 2012).

O maior ganho em peso e menor conversão alimentar dos girinos alimentados com suplementação dietética de *L. plantarum* pode ser explicado pelo melhor aproveitamento dos nutrientes em decorrência das enzimas digestivas produzidas por este micro-organismo, tais como: as leucina arilamidase, valina arilamidase e cistina arilamidase, que são enzimas do grupo aminopeptidase que clivam resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminais de proteínas e cadeias polipeptídicas (Bertin, Lozzi, Howell, Restrepo-Cadavid, Neves, Teixeira, De Sousa,

Norris & Santana 2005; Gonzales & Robert-Baudouy 1996; Matsui, Fowler & Walling 2006); as fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase pertencentes ao grupo enzimático fosfatase, cuja principal função é a desfosforilação de um grande número de moléculas incluindo nucleotídeos, alcaloides, proteínas e fósforos-orgânicos presentes na camada lipídica das membranas plasmáticas de células vegetais (Aoyama, Silva, Miranda & Ferreira 2003; Peres, Machado, Chitarra & Lima 2000); as α -galactosidase e β -galactosidase são enzimas que catalizam a hidrólise de ligações α -(1,6)- galactosídicas. Estas ligações estão presentes em determinados oligossacarídeos, os quais constituem fatores antinutricionais em algumas leguminosas como feijão, ervilha e principalmente soja. Ao ser clivar a ligação α -(1,6)- galactosídica, tem-se um subproduto melhor absorvido pelos animais (de Góes & Ribeiro 2002). Estas enzimas são relatadas para algumas bactérias como: *Bacillus stearothermophilus* (Porter, Sarikaya, Herrmann & Ladisch 1992), *Bifidobacterium breve* (Sakai, Tachiki, Kumagai & Tochkura 1987), *B.longum* (Garro, Giori, De Valdez & Oliver 1994) e *Lactobacillus fermentum* (Garro, de Valdez, Oliver & de Giori 1996); a β -glucosidase tem como função a clivagem de celulose e outros carboidratos para a absorção dos nutrientes como, por exemplo, a quebra do dissacarídeo celubiose liberando a glicose (Jeng, Wang, Lin, Lin, Liaw, Chang, Liu, Liang & Wang 2011 Teugjas & Valjamae 2013a; Teugjas & Valjamae 2013b; Peres *et al.* 2000); e a N-acetil- β -glucosaminidase pertencente ao grupo enzimático glicosidase, as quais atuam na hidrólise de glicoproteínas degradando-as à aminoácidos (Litzinger, Fischer, Polzer, Diederich, Welte & Mayer 2010; Gonçalves, Paoliello, Janeiro & Junior 2008).

Diferentemente do encontrado no presente trabalho, França *et al.* (2008) não observaram diferenças significativas na conversão alimentar e no ganho de peso, embora tenham observado tendência de maior crescimento nos grupos de rã-touro recém metamorfoseada, que receberam suplementação dietética do probiótico comercial *Bacillus subtilis* em diferentes dosagem (2,5, 5 e 10 g.kg⁻¹). A suplementação deste produto comercial não influenciou na sobrevivência, assim como na presente pesquisa onde a sobrevivência não foi afetada pela suplementação da cepa autóctone. Dias *et al.* (2008) suplementaram rã-touro recém metamorfoseada com dois probióticos comerciais distintos, P1-*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* e P2- *B. subtilis* em duas dosagem, 5 e 10g.kg⁻¹ e também não averiguaram diferença na sobrevivência dos animais, contudo, observaram pior conversão alimentar no grupo P2 independente da dose,

e o ganho de peso só foi maior no grupo suplementado em relação ao controle próximo a metade do experimento nos 56° e 84° dias.

O maior ganho de peso no grupo suplementado pode ser elucidado, também, pela alta concentração do micro-organismo láctico e de seus produtos extracelulares na ração, e conseqüentemente, maior contagem de ácido-láctico no trato gastrointestinal dos animais (10^6 UFC·ml⁻¹). A contagem de bactéria láctica na ração se manteve em torno de 10^7 UFC·g⁻¹ do início ao final de cada semana, semelhante à concentração reportada por Mourinho *et al.* (2012) na suplementação de *Weissella cibaria* autóctone para surubins híbridos. Similarmente ao presente estudo, os autores observaram aumento na contagem de bactérias lácticas no trato intestinal, mas não observaram diferença na concentração de bactérias heterotróficas totais. Semelhante a este trabalho, Jatobá *et al.* (2011) mantiveram alta concentração do micro-organismo *L. plantarum* autóctone na ração (10^8 UFC·g⁻¹) em dieta para tilápia do Nilo, e observaram maior ganho de peso, maior concentração de bactérias ácido-láctica e menor concentração de bactérias heterotróficas totais por grama de intestino. Entretanto, a sobrevivência não diferiu de forma significativa das tilápias não suplementadas. Já em pesquisa realizada com truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* suplementadas com *L. rhamnosus* autóctone as concentrações que promoveram melhorias nos parâmetros imunológicos foram 10^4 – 10^6 UFC·g⁻¹ de ração (Nikoskelainen *et al.*, 2003), valor inferior ao utilizado no presente estudo.

A suplementação dietética de *L. plantarum* para girinos de rã-touro não promoveu alterações histológicas na porção anterior do intestino, mantendo a integridade do tecido epitelial. Assim como reportado por Arauco, De Stéfani, Nakaghi & Oliveira-Bahia (2007) em seu estudo de adição de própolis nas concentrações 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5%, em dietas para estes mesmos animais no estágio 26 de Gosner até o estágio 42 (Gosner 1960). As condições observadas no epitélio intestinal do presente estudo como: frouxidão do tecido conjuntivo, início da formação dos vilos e pontos de melanização na periferia dos vasos sanguíneos e serosa são características comuns ao estágio de desenvolvimento em que os animais se encontravam G3 ou 30-40 de Gosner (Gosner 1960; Bagnara 1976; Junquera, Azanza, Castiella & Castejón 1987; Seixas Filho, Gomes, Aguiar, Hipolito, Martins & Chaves 2008; Lalremsanga & Hooroo 2012). Entretanto, observou-se no intestino de ambos os grupos, presença de leucócitos granulares PAS-positivo, melanomacrófagos e centros de melanomacrófagos, os quais são incomumente observados neste órgão. Estas células são reponsáveis

por resposta imunológica e podem aumentar seu número em presença de agressões ambientais e xenobiontes (Agius & Roberts 2003; Jantawongsri, Thammachoti, Kitana, Khonsue & Kitana 2013).

Conclusão

A bactéria *L. plantarum* autóctone de rã-touro produziu diversas enzimas digestivas que podem ter auxiliado na nutrição dos girinos. Sua suplementação em dietas para girinos de rã-touro apresentou boa colonização da ração e do trato intestinal, proporcionou melhorias no desempenho em ganho de peso e conversão alimentar sem comprometer a sobrevivência e a integridade do epitélio intestinal. Sendo assim, *L. plantarum* autóctone tem potencial probiótico para girinos de *L. catesbeianus*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo a SA Pereira, e a Ranac Ltda, uma empresa localizada em Antônio Carlos/Santa Catarina, Brasil pelo fornecimento dos girinos de rã-touro.

Referências

- Afonso A.M. (2012) Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. *Visão Agrícola* **11**, 33-35.
- Agius C. & Roberts R.J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* **26**, 499-509.
- Albinati R.C.B., Lima S. & Donzele J. (2001) Digestive energy levels in bullfrog's tadpole diet Revista *Brasileira de Saúde da Produção Animal* **2**, 48-52.
- ANVISA (2003) POPFQ–UNI031, de acordo com RDC n° 360.
- Aoyama H., Silva T.M.A., Miranda M.A. & Ferreira C.V. (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova* **26**, 896-900.

- Arauco L.R.R., De Stéfani M.V., Nakaghi L.S.O. & Oliveira-Bahia V.R.L.D. (2007) Histology of kidney, liver and intestine of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) fed with diets containing propolis. *Ciência. Rural* **37**, 1436-1441.
- Bagnara J.T. (1976) Color change. **In:** *Physiology of the Amphibia* (ed by Lofts B). Academic Press, 1, 1-52.
- Balcázar J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D. & Múzquiz J.L. (2006) Review: The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **114**, 173–186.
- Bertin P.B., Lozzi S.P., Howell J.K., Restrepo-Cadavid G., Neves D., Teixeira A.R.L., de Sousa M.V., Norris S.J. & Santana J.M. (2005) The Thermophilic, Homohexameric Aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* Is a Member of the M29 Family of Metallopeptidases. *Infection and Immunity* **73**, 2253-2261.
- Cabello F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* **8**, 1137-1144.
- Cribb Y.A., Afonso M.A. & Ferreira M.C. (2013) Manual Técnico de Ranicultura. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (Embrapa), 0-73.
- De Góes S.P. & Ribeiro M.L.L. (2002) α -galactosidase: general aspects and its application on soybean oligosaccharides. *Semina: Ciências Agrárias* **23**, 111-119.
- Dias D., Stéfani M., Ferreira C. & França F. (2008) Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. *Archivos de Zootecnia* **57** (220), 449-455.
- Dias D.D., De Stefani M.V., Ferreira C.M., Franca F.M., Ranzani-Paiva M.J.T. & Santos A.A. (2010) Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research* **41**, 1064-1071.

- FAO 2014 World aquaculture production by species groups. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/b-1.pdf>. Acesso em 25/03/2015.
- Feix R.D., Abdallah P.R. & Figueiredo M.R.C. (2006) Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. *Informações Econômicas* **36**, 3, 70-80.
- Franca F.M., Dias D.D.C., Teixeira P.C., Marcantonio A.S., de Stefani M.V., Antonucci A., Da Rocha G., Tavares Ranzani-Paiva M.J. & Ferreira C.M. (2008) Effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on growing, survival and physiology in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca* **34**, 403-412.
- Garro M.S., de Giori G.S., de Valdez G.F. & Oliver G. (1994) α -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 16-19.
- Garro M.S., de Valdez G.F., Oliver G. & De Giori G.S. (1996) Purification of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology* **45**, 103-109.
- Gonçales L.N., Paoliello M.M.B., Janeiro V. & Junior M.M. (2008) N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an early biomarker of renal dysfunction due to occupational exposure to inorganic lead. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **44**, 241-247.
- Gonzales T. & Robert-Baudouy J. (1996) Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS microbiology reviews*, **18**, 319-344.
- Gosner K.L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**, 183-190.
- Grenard S. (2007) Frogs and Toads: *Your Happy Healthy Pet*, John Wiley & Sons, 2ed, 0-128.
- Heatley J.J. & Johnson M. (2009) Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **18**, 14-19.

- Humason GL (1979) *Animal tissue techniques* WH Freeman & CO, 4th edn.
- Jantawongsri K., Thammachoti P., Kitana J., Khonsue W. & Kitana N. (2013) Comparison herbicide utilization in paddy field alters immune response of the rice frog *Fejervarya limnocharis* living in agricultural area at Nan Province, Thailand. *ESHM*, 1-6.
- Jatoba A., Vieira F.D., Buglione-Neto C.C., Mourino J.L.P., Silva B.C., Seiffter W.Q. & Andreatta E.R. (2011) Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology Biochemistry*, **37**, 725-732.
- Jatoba A., Vieira F.D., Neto C.B., Silva B.C., Mourino J.L.P., Jeronimo G.T., Dotta G. & Martins M.L. (2008) Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **43**, 1201-1207.
- Jeng W.Y., Wang N.C., Lin M.H., Lin C.T., Liaw Y.C., Chang W.J., Liu C.I., Liang P.H. & Wang A.H.J. (2011) Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, **173**, 46-56.
- Junquera C., Azanza M.J., Castiella T. & Castejón C.P. (1987) Melanin storing cells in anuran gut. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **87**, 329-333.
- Lalremsanga H. & Hooroo R. (2012) Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Microhyla berdmorei* (Anura: *Microhylidae*). *International Multidisciplinary Research Journal*, **2**, 35-40.
- Litzinger S., Fischer S., Polzer P., Diederichs K., Welte W. & Mayer C. (2010) Structural and Kinetic Analysis of *Bacillus subtilis* N-Acetylglucosaminidase Reveals a Unique Asp-His Dyad Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 35675-35684.
- MAPA (1991) Produtos ou subprodutos de origem vegetal, rações e concentrados: POPFQ-UNI031, de acordo com Portaria nº 108.

- Matsui M., Fowler J.H. & Walling L.L. (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological chemistry*, **387**, 1535-1544.
- Mendoza G.M., Pasteris S.E., Ale C.E., Otero M.C., Buhler M.I. & Nader-Macias M.E.F. (2012) Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. *Research in Veterinary Science*, **93**, 1160-1167.
- Merrifield D.L., Bradley G., Baker R.T.M. & Davies S.J. (2010a) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, **16**, 496-503.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bogwald J., Castex M. & Ringo E. (2010b) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, **302**, 1-18.
- Merrifield D.L. & Ringo E. (2014) *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, Wiley-Blackwell, 0-488.
- Mouriño J.L.P., Vieira F.N., Jatobá A.B., Da Silva B.C., Jesus G.F.A., Seiffert W.Q. & Martins M.L. (2012) Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquaculture Nutrition*, **18**, 73-80.
- Mouriño J.L.P., Martins M.L., Yamashita M.M., Batista C.R.V. & Pereira M.A. (2006) Isolation of *Aeromonas hydrophila* in bullfrog tadpoles in the transformation stage, *Embrapa Informação Tecnológica*, **41**, 8,1325-1327.
- Moreira, C.R., Henriques, M.B. & Ferreira, C.M. (2013) Frog Farms as Proposed in Agribusiness Aquaculture: Economic Viability Based in Feed Conversion. *Boletim do Instituto de Pesca* **39**, 389-399.

- Nayak S.K. (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunology*, **29**, 2-14.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S. & Lilius E.M. (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunology*, **15**, 443-452.
- Pasteris S.E., Babot G.R., Otero M.C., Buhler M.I. & Nader-Macias M.E. (2009) Beneficial properties of lactic acid bacteria isolated from a *Rana catesbeiana* hatchery. *Aquaculture Research*, **40**, 1605-1615.
- Pasteris S.E., Guidoli M.G., Otero M.C., Bühler M.I. & Nader-Macías M.E. (2011) In vitro inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. *Veterinary Microbiology*, **151**, 336-344.
- Pasteris S.E., Pingitore E.V., Ale C.E. & Nader-Macias M.E.F. (2014) Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **30**, 1053-1062.
- Peres Â.P., Machado J.D.C., Chitarra A.B. & Lima L.C.D.O. (2000) comunicação perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. *Ciência e agrotecnologia*, **24**, 295-299.
- Porter J.E., Sarikaya A., Herrmann K.M. & Ladisch M.R. (1992) Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, **14**, 609-613.
- Ranzani-Paiva M. & Silva-Souza A. (2004) Hematologia de peixes brasileiros. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 89-120.
- Sakai K., Tachiki T., Kumagai H. & Tochkura T. (1987) Hydrolysis of α -d-Galactosyl Oligosaccharides in Soymilk by α -d-

Galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 315-322.

- Schmale M.C., Vicha D. & Cacal S.M. (2004) Degranulation of eosinophilic granule cells in neurofibromas and gastrointestinal tract in the bicolor damselfish. *Fish Shellfish Immunology*, **17**, 53-63.
- Seixas Filho J.T.d., Gomes L.H., Aguiar D.V.C., Hipolito M., Martins A.M.C.R.P.d.F. & Chaves A.C.P. (2008) Avaliação histológica do intestino médio, do fígado e do pâncreas de girinos de rã-touro alimentados com rações comerciais formuladas com três níveis de proteína bruta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **37**, 2090-2096.
- Seixas Filho J.T.d., Navarro R.D., Pereira M.M., Mello S.C.R.P., Lanna E.A.T. & Lima J.L.P. (2012) Zootechnical performance of bullfrog tadpoles under different levels of digestible protein and energy. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **13**, 1112-1120.
- Silva M.R., Dias G., Ferreira C.L.L.F., Franceschini S.C.C. & Costa N.M.B. (2008) Growth of preschool children was improved when fed an iron-fortified fermented milk beverage supplemented with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutrition Research*, **28**, 226-232.
- Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, S.; Firat, K.; Otgucuoglu Ö. & Küçüksari, H. (2008) *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Journal of Aquaculture*, **280**, 140-145.
- Teugjas H. & Valjamae P. (2013a) Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels*, **6**, 104, 1-14.
- Teugjas H. & Valjamae P. (2013b) Selecting beta-glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, **6**, 105, 1-13.

CONCLUSÃO GERAL

Foi possível isolar 20 cepas de bactérias autóctones no trato intestinal de rã-touro. E selecionou-se a cepa autóctone com maior potencial probiótico *in vitro* a *L. plantarum*. Este micro-organismo foi capaz de produzir nove enzimas digestivas a leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase e N-acetil- β -glucosaminidase. A suplementação de *L. plantarum* em dieta para girinos de rã-touro promoveu melhorias zootécnicas como maior ganho de peso, menor conversão alimentar, sem alterar a morfologia intestinal, além de colonizar a ração e o trato intestinal, mantendo-se em altas concentrações. Dessa forma, a suplementação da cepa autóctone *L. plantarum* se figura com grande potencial probióticos para girinos de *L. catesbeianus*.

CONSIDERAÇÃO FINAL

A ranicultura é uma atividade promissora e para seu contínuo crescimento deve-se atentar a novas investigações a cerca de: desenvolvimento de vacinas biossegura, eficaz e economicamente acessível ao produtor rural contra, principalmente, *Ranavirus* e o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, os quais são doenças de notificação obrigatória que acarretam em grandes perdas na produção e declínio na população de anfíbios; alternativas ao uso corriqueiro e indiscriminado de antibióticos como a seleção e suplementação de probióticos autóctones em dietas para adultos de rãs; após a suplementação com probióticos autóctones realizar um desafio experimental com patógenos frequentemente associados a ranicultura, afim de, verificar possível imunestimulação e/ou imunomodulação do sistema imune dos animais; definir dosagem e momentos mais oportunos para a suplementação de probióticos autóctones; selecionar metodologias de suplementação dos probióticos em dietas como a microencapsulação; utilização dos compostos produzidos pelos micro-organismos probióticos como os ácidos orgânicos que podem ser adicionas nas dietas com maior facilidade e em escala industrial, estudos de sua suplementação para peixes e camarões têm demonstrado efeitos positivos no desempenho zootécnico e no combate a bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AFONSO, A.M. Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. **Visão Agrícola**, vl. 11, p.33-35, 2012.

ALMEIDA, A. C.; RISTOW, L. E.; BUELTA, T. T. M. Caracterização microbiológica e clínica de surtos de "red leg" em Minas Gerais e avaliação do efeito bactericida *in vitro* do Vantocil IB[®] para *Aeromonas hydrophila*. **Ciência Rural**, vl. 30, p. 661-664, 2000.

BAGGIO SILVA, P.; et al. **Criação de rã**: Estudo de viabilidade para implantação de ranário na região de Mogi Mirim/SP. *Universitas*, vl. 2, p. 97-119, 2009.

BALCÁZAR, J. L.; et al. **Review**: The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, vl. 114:, p. 173–186, 2006.

BARROS, G. C.; et al. Surto de micobacteriose em criação de rãs (*Rana catesbeiana*) causado por *Mycobacterium marinum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vl. 8, p. 75-80, 1988.

BOTH, C.; et al. Widespread occurrence of the american bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. **South American Journal of Herpetology**, vl. 6, p. 127-134, 2011.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA n° 13, de 30 de novembro de 2004. Disponível em <http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/instrucao_normativa_013.htm>. Acesso em: 1 de agosto, 2014.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, vl. 8, p. 1137-1144, 2006.

CABRAL, A.D.; et al. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) no município de Uberlândia, MG, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, vl. 12, p. 109-114, 2011.

CRIBB, A. Y.; AFONSO, A. M.; MOSTÉRIO, C. M. F. 2013. **Manual Técnico de Ranicultura**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 73p.

COGHLAN, A. Vaccine could stop frog killing fungus. **New Scientist**, vl. 223, p. 10-10, 2014.

COLOMBANO, N. C.; FENERICK JÚNIOR, J.; DE STÉFANI, M. V.; MORAES, F. R.; SOUZA, M. A.; MALHEIROS, E. B. Suplementação alimentar com vitamina C e desempenho zootécnico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Acta Scientiarum Animal Science**, vl. 29, p. 333-338, 2007.

CUNNINGHAM, A.; et al. Pathological and microbiological findings from incident cases of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*), **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science**, vl. 351, p. 1539-1557, 1996.

DE STÉFANI, M.V.; MARCANTONIO, A. S.; MARTINS M. L. Suplementação com vitamina C e E sobre o desenvolvimento e sobrevivência de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). **Ciência Rural**, vl. 31, p. 869-871, 2001.

DIAS, D. C.; et al. Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. **Archivos de Zootecnia**, vl. 57, p. 449-455, 2008.

DIAS, D. C. S; et al. Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. **Aquaculture Research**, vl. 41, p. 1064 – 1071, 2010.

DU, C. C.; MASHOOF, S. M.; CRISCITIELLO, M. F. Oral immunization of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) upregulates the mucosal immunoglobulin IgX. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vl. 145, p. 493– 498, 2012.

ENCARNAÇÃO, P. Varied Feed Additives Improve Gut, Animal Health. **Global Aquaculture Advocate**, vl. 3, p. 41- 41, 2010.

FAO 2014, <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/b-1.pdf> World aquaculture production by species groups. Acesso em 25/07/2014

FEIX, R. D.; ABDALLAH, P. R.; FIGUEIREDO, M.R.C. Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. **Informações Econômicas**, SP, vl. 36, p. 70-80, 2006.

FENERICK JUNIOR, J.; STÉFANI, M. V.; MARTINS, M. L. Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais. **Boletim do Instituto de Pesca**, vl. 32, p. 173-181, 2006.

FERREIRA, R.; et al. A report of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **The veterinary Journal**, vl. 171, p. 177-180, 2006.

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA NETO, J.S. Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, vl. 33, p. 1-15, 2002.

FONTANELLO, D.; et al. Ganho de peso de rãs-touro (*Rana catesbeiana*, SHAW) criadas em gaiolas individuais de diferentes tamanhos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, vl. 15, p. 45-49, 1988.

FONTANELLO, D.; et al. Comparação de quatro sistemas de engorda de Rãs-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802): Tanque-Ilha, Confinamento, Anfigranja e Gaiolas. 1 - Desenvolvimento ponderal; 2 - Custo operacional. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, vl. 20, p. 43 – 58, 1993.

FREITAS, J. J. G.; et al. Resposta hepática à suplementação alimentar em rãs-touro sob condição de estresse. **Boletim do Instituto de Pesca**, vl. 40, p. 261 – 269, 2014.

GALLI, L.; et al. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw 1802) from South America. **Aquaculture**, vl. 257, p. 78–82, 2006.

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

HIPOLITO, M. 2004. **Manejo sanitário no cultivo de rã**. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P.

(Ed.). Sanidade de Organismos Aquáticos. São Paulo: Varela, p. 333-353.

HOVERMAN, J. T.; GRAY, M. J.; MILLER, D. L. Anuran susceptibilities to ranaviruses: role of species identity, exposure route, and a novel virus isolate. **Diseases of Aquatic Organisms**, vl. 89, p. 97-107, 2010.

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

KNOOP, R.; et al. Influência da incorporação de vitamina C à dieta no desempenho produtivo de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* pós-metamorfoseadas. **Boletim do Instituto de Pesca**, vl. 37, p. 383 – 391, 2011.

KNOOP, R.; et al. Vitamin C supplementation has no effect on American bullfrog's immune response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, May, 2014.

KUPFERBERG, S. J.; et al. Parasitic copepod (*Lernaea cyprinacea*) outbreaks in foothill yellow-legged frogs (*Rana boylei*) linked to unusually warm summers in northern California. *Copeia*, vl.3, p. 529-537, 2009.

LEVER, C. Naturalized amphibians and reptiles of the world. New York: Oxford University Press. 2003.

LIMA, S. L. & AGOSTINHO, C. A. **A criação de rãs**. 3 ed. São Paulo: Editora Globo, 187p. 1988.

LIMA, S. L. Situação Atual e Perspectivas da Ranicultura. **Panorama da Aquicultura**. vl. 15, p. 32-34, 2005.

LÜCKSTÄDTS, C. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. **Feed Mix**, vl. 14, p. 11-12, 2006.

MAGNADOTTIR, B. Immunological Control of Fish Diseases. **Marine Biotechnology**, vl.12, p. 361-379, 2010.

MARTINS, M. L. & SOUZA JR., F. R. Infestação experimental em girinos de *Rana catesbeiana* Shaw por copepoditos de *Lernaea cyprinacea* Linnaeus (Copepoda, Lernaeidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, vl. 12, p. 619-625, 1995.

MARTINHO, F.; HEATLEY, J.J. Amphibian mycobacteriosis. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, vl. 15, p. 113-119, 2012.

MAZZONI, R.; et al. Cría de ranas em “Sistema Inundado”, experiencias en ranarios comerciales. In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA & TECHNOFROG’95**, 8, Viçosa, 1995.

MAZZONI, R.; et al. Mass mortality associated with a frog vírus 3-like Ranavírus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, vl. 86, p. 181-191, 2009.

MENDOZA, G. M.; et al. Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. **Research in Veterinary Science**, vl. 93, p. 1160–1167, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-proibidos>. Acesso em: 01 de agosto de 2014.

MOREIRA, C. R.; HENRIQUES, M. B.; FERREIRA, C. M. Frog farms as proposed in agribusiness aquaculture: economic viability based in feed conversion. **Boletim do Instituto de Pesca**, vl. 39, p. 389-399, 2013

MOSTÉRIO, C. M. F.; MAZZONI, R.; HIPÓLITO, M. 2014. **Principais patologias de anfíbios em criadouros comerciais**. In: MADI, R. R.; et al (Org.). Patologia e Sanidade em Ambientes Aquáticos, p.115-135.

MOURIÑO, J. L. P.; et al. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vl. 8, p. 1325-1327, 2006.

NÓBREGA, I. C. C.; et al. Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. **Food Chemistry**, vl. 102, p. 186-191, 2007.

OIE. Infection with ranavirus. **OIE Aquatic Animal Disease Cards**, 2007,

OIE. The World Organisation for Animal Health 2011 Infection with ranavirus. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/en_chapitre_1.8.2.pdf> Acesso em julho de 2014.

OLIVEIRA, G.A. Instalação de ranários. In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES**, 3, Uberlândia/MG, Anais.....Uberlândia, MA/MEC/UFU. p.41-58. 1983.

PASTERIS, S.; BUHLER, M.; NADER-MACIAS, M. Microbiological and histological studies of farmed-bullfrog (*Rana catesbeiana*) tissues displaying redleg syndrome. **Aquaculture**, vl. 251, p. 11-18, 2006.

PASTERIS, S. E.; et al. In vitro inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. **Veterinary Microbiology**, vl. 151, p. 336-344, 2011.

PASTERIS, S. E.; et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery. **World Journal of Microbiological Biotechnology**, vl. 30, p. 1053–1062, 2014.

PILARSKI, F. & SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Isolamento e resistência a antimicrobianos de cepas de *Streptococcus* spp. provenientes de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vl. 62, p. 1275-1279, 2010.

PIRES, C. V.; et al. Nutritional quality and chemical score of amino acids from diferente protein sources. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vl. 26, p. 179-187, 2006.

PRIDGEON, J. W. & KLESIUS, P.H. Fish Vaccines In Aquaculture: Proactive Treatment Protects Salmon, Catfish, Other Fish. **Global Aquaculture Advocate**, vl.13(3), p. 44-45, 2010.

RUTHIG, G. R. Temperature and water molds influence mortality of *Lithobates catesbeianus* eggs. **Herpetological Conservation and Biology**, vl. 8, p. 707-714, 2013.

SEIXAS FILHO, J.T.; et al. Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vl. 43, p. 1617-1624, 2008.

SHARIFIAN-FARD, M.; et al. Invasive bullfrogs constitute a reservoir of ranaviruses. **Emerging Infectious Diseases**, vl.17, p. 2371–2372, 2011.

SOUZA JUNIOR, F. L.; HIPOLITO, M. Manejo sanitário de criação de rãs. In: **Encontro Nacional de Ranicultura**, 11., 2001, Bragança Paulista, SP. Anais. Bragança Paulista: Abetra, 2001. p. 1-34.

SOUZA, JR., F. L.; et al. Cases of buccal myiasis in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), with larvae of *Notochaeta* sp. Aldrich, 1916 (Diptera: Sarcophagidae) in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vl. 84, p. 517-518, 1989.

SOUZA JR., F. L.; ARTIGAS, P. T.; MARTINS, M. L.; *Longibucca catesbeianae* n.sp. (Nematoda: Cylandrocorporidae), a gastrointestinal parasite of the bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, vl. 53, p. 97-102, 1993.

STICE, M. J. & BRIGGS, C. J. Immunization is ineffective at preventing infection and mortality due to the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Journal of Wildlife Diseases**, vl. 46, p. 70–77, 2010.

TEIXEIRA, P.C. **Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea.** São Paulo. 86p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 2007.

VOYLES, J.; et al. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, vl. 326, p. 582-585, 2009.

ANEXO I




Setor de Microbiologia LCM - FLORIANÓPOLIS

API 50 CHL V5.2 [Impressão](#) [Exportar](#) [Novo teste](#) [Modificação](#)

REFERÊNCIA: DATA:

COMENTÁRIO:

EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO

Galeria	API 50 CHL V5.2		
Perfil	-----+		
Nota(s)			

Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes			
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.85	SOR 78%			

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes			
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.15	RHA 0%	MDM 0%	MLZ 14%	TUR 14%

API

- API 10S
- API 20 A
- API 20 C ALX
- API 20 E
- API 20 NE
- API 20 STREP
- API 50 CHB
- API 50 CHE
- API 50 CHL
- API CAMPY
- API CANDIDA
- API CORYNE
- API LISTERIA
- API NH
- API STAPH
- RAPID 20 E

ID32



ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 1925 / 2015 Data de Entrada: 20/02/2015

Nome do Produto: **RAÇÃO COMERCIAL PROBIÓTICO**
Data de Fabricação: 12/02/2015 Data de Vencimento: NA
Marca: NICOLUZZI Nº do Lote: NA
Data e Hora da Coleta: 12/02/2015 - 10h00m Nº do Lacre: NA
N. Amostras: 1 Nº. Unid. Amostras: 2 Peso/Volume: 0315 gramas
Amostrado e Coletado por: Cliente Embalagem: a vácuo
Fabricante: NICOLUZZI RAÇÕES LTDA. SIF 4330
Solicitante: JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURINÓ
Responsável: JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURINÓ
Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga, 1346
Complemento:
Bairro: Itacorubi CEP: 88040900
Cidade: Florianópolis UF: SC
CNPJ/CPF: 278.036.258-86 Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Enviado e coletado por: Scheila Anelise Pereira - Local da coleta: Lab. de camarões marinho (LCM/UFSC) - Cond. do local da coleta: Seco e protegido da luz - Temp. na coleta: 25°C - Temp. no receb. da amostra: Ambiente.

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 24/02/2015	DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 09/03/2015
FÍSICO-QUÍMICA	Analista: Patrícia Taha - CRF/SC - 1763
Carboidratos totais	48,73 g/100g (Método: RDC nº 360)
Extrato etéreo	4,68 g/100g (Método: IAL, p. 119)
Matéria fibrosa (fibra bruta)	1,5 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Matéria mineral	6,09 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Proteína	25,44 g/100g (N total X 6,25) (Método: Portaria nº 108)
Umidade e voláteis	13,56 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Valor calórico total	338,80 kcal/100g ou 1434,05 kJ/100g (Método: RDC nº 360)

Metodologia(s):

(**)INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed. Brasília: Editora MS, 2005. 1018 p.

(***)BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária- SDA- Portaria nº 108 de 04/09/1991 - Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal: Pub. D.O. 17/09/1991.MAPA

(*)BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. D.O.U. de 26/12/2003. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2003.

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 1926 / 2015 Data de Entrada: 20/02/2015

Nome do Produto: **RAÇÃO COMERCIAL CONTROLE**

Data de Fabricação: 12/02/2015 Data de Vencimento: NA

Marca: NICOLUZZI Nº do Lote: NA

Data e Hora da Coleta: 12/02/2015 - 10h00m Nº do Lacre: NA

N Amostras: 1 Nº Unid. Amostras: 2 Peso/Volume: 0315 gramas

Amostrado e Coletado por: Cliente Embalagem: a vácuo

Fabricante: NICOLUZZI RAÇÕES LTDA. SIF 4330

Solicitante: JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURINÓ

Responsável: JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURINÓ

Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga, 1346

Complemento: CEP: 88040900

Bairro: Itacorubi UF: SC

Cidade: Florianópolis

CNPJ/CPF: 278.036.258-86 Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Enviado e coletado por: Scheila Anelise Pereira - Local da coleta: Lab. de camarões marinho (LCM/UFSC)
- Cond. do local da coleta: Seco e protegido da luz - Temp. na coleta: 25°C - Temp. no receb. da amostra: Ambiente.

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 24/02/2015 DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 12/03/2015

FÍSICO-QUÍMICA Analista: Patrícia Taha - CRF/SC - 1763

Carboidratos totais	48,54 g/100g (Método: RDC, nº 360)
Extrato etéreo	4,87 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Matéria fibrosa (fibra bruta)	1,5 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Matéria mineral	5,92 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Proteína	24,85 g/100g (N total X 6,25) (Método: Portaria nº 108)
Umidade e voláteis	14,32 g/100g (Método: Portaria nº 108)
Valor calórico total	337,39 kcal/100g ou 1427,82 kJ/100g (Método: RDC, nº 360)

Metodologia(s):

(**)BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária- SDA- Portaria nº 108 de 04/09/1991 - Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal: Pub. D.O. 17/09/1991.MAPA

(*)BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. D.O.U. de 26/12/2003. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2003.

----- Continua

Documento Nº: GA-FOR 01 5.10	Revisão 01	Data Emissão 20/08/2013	Página 1
---------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

ANEXO II

Continuação Protocolo: 1926 Data de Entrada: 20/02/2015

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S) ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou os resultados acima descritos.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 17 de Março de 2015

Signatário Autorizado

Giselle Olivo
CRP-GC 8027
Físico-Química - LABCAL

Documento Nº.	Revisão	Data Emissão	Página
GA-FOR 01 5.10	01	20/08/2013	2