



**Estudo da aplicação de probióticos na aquacultura de
linguado senegalês (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**

Andreia Ferreira Domingues

2014



**Estudo da aplicação de probióticos na aquacultura de
linguado senegalês (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**

Andreia Ferreira Domingues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Rodrigo Ozório,
supervisão da Mestre Sónia Batista e co-orientação do Doutor João Correia

2014

Título: Estudo da aplicação de probióticos na aquacultura de linguado senegalês (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)

Copyright © Andreia Ferreira Domingues

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2014

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A dissertação de mestrado aqui apresentada só foi possível devido ao empenho, dedicação e trabalho de inúmeras pessoas, que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização da mesma. Como tal, gostava de agradecer:

Ao Doutor Rodrigo Ozório e à Professora Doutora Luísa Valente por me terem aceite como estagiária e por todo o apoio, orientação e disponibilidade que demonstraram ao longo do meu estágio.

À Sónia Batista e ao Benjamín Costas por toda a disponibilidade e orientação dada ao longo deste trabalho. As orientações prestadas foram sem dúvida decisivas na realização desta dissertação.

Ao grupo de trabalho do LANUCE – M^a João, Vera, Lúcia, Sthelio, Francisca, Mariana, Marta e Eduarda, por toda a paciência, motivação, integração e apoio. Estou muito grata pelo companheirismo vivido durante todo o tempo que estive na vossa companhia. À Sofia Cunha pela disponibilidade e orientações prestadas.

À minha mãe M^a de Fátima, Marina e Bruno pela paciência, apoio incondicional e conselhos nos momentos mais difíceis.

A todos um muito obrigada!!!

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto PROBIOSOLEA - Seleção e avaliação de estirpes de probióticos para uso na aquacultura do linguado (*Solea senegalensis*). Co-financiado pelo Quadro de Referência Estratégico Nacional – QREN (referencia 13551), no âmbito do Programa Operacional Regional do Norte – ON2.



O NOVO NORTE
PROGRAMA OPERACIONAL
REGIONAL DO NORTE

Até ao momento, deste trabalho resultou uma comunicação oral, encontra-se em preparação um artigo e a participação num congresso:

Comunicação Oral:

Ozório R., **Domingues A.**, Peixoto M.J., Batista S. Probióticos na atividade antioxidante e resposta imune em linguados (*Solea senegalensis*). In: Seminário-PROBIOSOLEA: Seleção e avaliação de estirpes de probióticos para uso na aquacultura do linguado (*Solea senegalensis*). Porto, Novembro de 2013

Artigo (em preparação):

Domingues, A., Peixoto M.J., Braga, S., Gravato C., Batista, S., Gonçalves J.F.M., Cunha, S., Valente L.M., Barros R., Cristóvão B., Costas, B., Ozório R.O.A. (2014). Immune and oxidative stress responses following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in sole (*Solea senegalensis*) fed different microbial probiotics.

Participação em Congressos:

Domingues, A., Peixoto, M. J., Batista, S., Gonçalves, J.F.M., Cunha, S., Gomes, A., Barros, R., Valente, L.M.P., Costas, B., Ozório, R.O.A. (2014). Effect of dietary probiotic supplementation on growth and innate immune system in sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) subjected to pathogenic bacteria infection and handling stress. International Meeting on Marine Research (IMMR), Peniche, Portugal.

A ocorrência de doenças infecciosas na aquacultura é inevitável devido às condições de cultura praticadas. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* causa grandes perdas económicas na cultura de *Solea senegalensis*, mas a suplementação com probióticos pode ser uma boa alternativa para o controlo de doenças bacterianas diminuindo ainda o uso de antibióticos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da suplementação com probióticos sobre o crescimento, resposta imunológica inata e proteção contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em linguados juvenis (*Solea senegalensis*).

Foram testadas 6 dietas experimentais: dieta CTRL (sem probiótico), duas mono-espécies (PB₁ - *Shewanella* sp. e PB₂ - *Enterococcus* sp.) e três multi-espécies (PB₃ - *Shewanella* sp. e *Arthrobacter* sp., PB₄ - *Pseudomonas* sp. e *Arthrobacter* sp., PB₅ - *Shewanella* sp., *Arthrobacter* sp. e *Enterococcus* sp.). Realizou-se inicialmente um ensaio de crescimento onde os juvenis foram mantidos num sistema de recirculação semi-fechado de água salgada (19°C, 30‰) e alimentados *ad libitum* 3 vezes por dia durante 12 semanas. Posteriormente realizaram-se dois ensaios de infeção com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, no ensaio A os animais foram infetados no dia do transporte para novas instalações, no ensaio B os animais foram previamente aclimatizados às novas condições e só depois foram infetados. Em ambos os ensaios de infeção os juvenis foram mantidos em sistemas de recirculação fechados (19°C, 30‰), durante 15 dias e alimentados 2 vezes por dia.

No final do ensaio de crescimento verificaram-se diferenças significativas no crescimento dos animais alimentados com as dietas PB₂ (22,91 ± 0,53g) e PB₄ (24,03 ± 0,48g), apresentando um crescimento inferior aos juvenis da dieta CTRL (26,56 ± 0,63g). Nos parâmetros imunológicos (celulares e humorais) avaliados no final do ensaio de crescimento não se observaram diferenças significativas entre as dietas experimentais. Nos ensaios de infeção verificou-se que a mortalidade cumulativa dos juvenis do ensaio A foi nula e no ensaio B a mortalidade ocorrida não apresentou diferenças significativas entre os vários tratamentos. Na análise dos parâmetros inumunatos após infeção apenas a atividade da peroxidase apresentou diferenças

significativas. Para o ensaio A, o índice de estimulação foi significativamente menor nos peixes alimentados com a dieta PB₁ ($0,31 \pm 0,39$) quando comparado com os juvenis submetidos às dietas PB₄ ($1,31 \pm 0,59$) e PB₅ ($1,12 \pm 0,66$). Além disso, os peixes alimentados com o tratamento PB₃ ($0,36 \pm 0,39$) apresentaram valores significativamente mais baixos do que a dieta PB₄ ($1,31 \pm 0,59$).

Os resultados deste trabalho sugerem que as respostas imuno-inatas dos juvenis de linguado não foram influenciadas pela dieta por si só, mas mostram algumas alterações quando se associa o *stress* do factor abiótico (aclimatização) a um factor biótico (infecção).

Palavras-chave: Probióticos, *Solea senegalensis*, Crescimento, Sistema imunológico, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

ABSTRACT

The occurrence of infectious diseases in aquaculture is inevitable due to the culture conditions applied. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* causes major economic losses in cultured *Solea senegalensis*, but supplementation with probiotics may be a good alternative for the control of bacterial diseases also reducing the use of antibiotics. The objectives of this study were to evaluate the effects of probiotic supplementation on growth, innate immune response and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in juvenile sole (*Solea senegalensis*).

Fish were fed six experimental diets, one non-supplemented probiotic diet (CTRL), two mono-species probiotic diets (PB₁–*Shewanella* spp and PB₂–*Enterococcus* spp) and three multi-species probiotic diets (PB₃–*Shewanella* spp and *Arthrobacter* spp, PB₄–*Pseudomonas* spp and *Arthrobacter* spp, PB₅–*Shewanella* spp, *Arthrobacter* spp and *Enterococcus* spp). Fish were kept in a semi-closed recirculating sea-water system (19°C, 30‰) and fed *ad libitum* 3 times per day for 12 weeks. Growth performance and innate immune parameters (peroxidase and lysozyme activities and alternative complement pathway - ACH50) were analyzed.

After the growth trial, two infection trials (trial A and B) were carried out for 15 days to test the interaction between two variables: pathogenic infection (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) and stress associated with handling (acclimatization). Trial A: animals were infected on the same day of transport; trial B: animals were transported and acclimatized for 7 days before infection.

In growth trial, there were significant differences the growth of animals fed with PB₂ (22.91 ± 0.53g) and PB₄ (24.03 ± 0.48g) diets, showing a growth lower than juvenile CTRL (26.56 ± 0.63g) diet. On immunological parameters (cellular and humoral) evaluated at the end of the growth trial no significant differences were observed among the experimental diets.

After both infection trials, the cumulative mortality was not significantly different, regardless of the dietary treatment and stress factors tested. Generally, trial A (0.91 ± 0.75) tended to have higher Stimulation Index (SI) peroxidase activity than trial B (0.27 ± 0.22). For trial A, SI was significantly lower in fish fed PB₁ (0.31 ± 0.39) than

in fish fed PB₄ (1.31 ± 0.59) and PB₅ (1.12 ± 0.66). Moreover, fish fed PB₃ (0.36 ± 0.39) diet had significantly lower SI values than PB₄ (1.31 ± 0.59).

Our data suggest that the innate immune responses of sole was not influenced by diet alone, but it showed some changes when combining abiotic stress (acclimatization) to a biotic factor (infection).

Keywords: Probiotics, *Solea senegalensis*, Growth, Immune system, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*

ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XV
ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XVII
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enquadramento do tema	3
1.2 Objetivos.....	5
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Aquacultura	9
2.2 Linguado senegalês (<i>Solea senegalensis</i>).....	10
2.3 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	11
2.4 Probióticos	12
2.4.1 Definição de probiótico.....	12
2.4.2 Probióticos utilizados em práticas aquícolas	14
2.4.2.1 Regulamentação Europeia	18
2.4.2.2 Critérios de seleção de um agente probiótico	19
2.4.2.3 Mecanismos de ação dos probióticos	20
2.5 Sistema imunológico dos peixes.....	21
2.5.1 Resposta imuno-inata	22
2.5.1.1 Resposta celular	22

2.5.1.2	Resposta humoral	23
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS		25
3.1	Desenho experimental	27
3.1.1	Quarentena e Aclimatização dos animais	27
3.1.2	Ensaio de crescimento	28
3.1.2.1	Dietas experimentais.....	29
3.1.2.2	Determinação de parâmetros zootécnicos e morfométricos	30
3.1.3	Ensaio de infecção com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	31
3.1.3.1	Agente patogénico	32
3.1.3.2	Determinação da dose letal (LD ₅₀)	32
3.1.3.3	Ensaio de infecção (A e B) com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	33
3.2	Resposta Imunológica Inata	34
3.2.1	Recolha de plasma e macrófagos do rim cranial	35
3.2.2	Parâmetros imuno celulares	36
3.2.2.1	Explosão respiratória (ROS).....	36
3.2.2.2	Óxido nítrico (NO)	36
3.2.3	Parâmetros imuno humorais	37
3.2.3.1	Atividade da lisozima	37
3.2.3.2	Atividade da peroxidase	38
3.2.3.3	Atividade alternativa do complemento	38
3.3	Análises Químicas – Composição proximal	39
3.4	Estatística.....	40
CAPÍTULO IV – RESULTADOS.....		41
4.1	Ensaio de crescimento.....	43
4.1.1	Parâmetros zootécnicos e morfométricos.....	43
4.1.2	Composição proximal.....	43
4.1.2.1	Dietas e carcaças	43
4.1.3	Parâmetros Imunológicos	44
4.2	Ensaio de infecção com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	45
4.2.1	Determinação do LD ₅₀	45

4.2.2	Ensaio de infecção (A e B) com <i>Phdp</i>	46
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO		51
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES		61
PERSPETIVAS FUTURAS		65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		67
ANEXOS		79
ANEXO I – Determinação do LD₅₀ de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>		81
ANEXO II – Contagem de CFU de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>		83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Linguado senegalês (<i>Solea senegalensis</i>).	10
Figura 2: Mecanismos de ação dos probióticos em animais (adaptado de Protexin (2013)).	20
Figura 3: a) Sistema de quarentena; b) Tanque utilizado para os banhos profiláticos. ...	28
Figura 4: Tanques retangulares (50L) utilizados no ensaio de crescimento.....	28
Figura 5: a) Tanques circulares (63L) utilizados nos ensaios de infecção com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . b) Juvenis a serem alimentados.	33
Figura 6 – a) <i>Solea senegalensis</i> dissecado para realização da análise microbiológica dos órgãos; b) Placa de TSA com inóculo das bactérias isoladas dos órgãos de linguado senegalês.....	34
Figura 7 – a) Recolha de sangue, para posterior análise dos parâmetros humorais; b) Recolha do rim cranial em condições assépticas para análise dos parâmetros celulares; c) Maceração do rim para recolha de leucócitos: d) Anel de leucócitos na interface do gradiente de Percoll.	35
Figura 8: Carcaças de linguados trituradas	39
Figura 9: Mortalidade cumulativa (%) de <i>Solea senegalensis</i> quando infetados com diferentes concentrações de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (10^3 CFU mL ⁻¹ , 10^4 CFU mL ⁻¹ e 10^5 CFU mL ⁻¹) e o grupo CTRL injetados com HBSS $1 \times$ (n = 10 por tratamento).	45
Figura 10: Parâmetros imune-inatos em juvenis de linguado placebo (não infetados) e infetados com <i>Phdp</i> (infecções A e B). Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão (n = 36 por tratamento). Letras diferentes em expoente significam diferenças significativas (p<0,05) entre animais placebo e infetados.....	47
Figura 11: Atividade do complemento (ACH50) de juvenis de <i>Solea senegalensis</i> infetados com <i>Phdp</i> , infecção A e infecção B. Resultados estão expressos em índice de estimulação (média \pm desvio padrão; n=6). Asterisco (*) indica diferenças significativas (t-test; p<0,05) entre ensaios para a mesma dieta. A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre dieta*infecção (ANOVA a 2 fatores; p<0,05).....	48
Figura 12: Atividade da lisozima de juvenis de <i>Solea senegalensis</i> infetados com <i>Phdp</i> , infecção A e infecção B. Resultados estão expressos em índice de estimulação (média \pm desvio padrão; n=6). Asterisco (*) indica diferenças significativas (t-test; p<0,05) entre ensaios para a mesma dieta. A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre dieta*infecção (ANOVA a 2 fatores; p<0,05).	48
Figura 13: Atividade da peroxidase de juvenis de <i>Solea senegalensis</i> infetados com <i>Phdp</i> , infecção A e infecção B. Resultados estão expressos em índice de estimulação (média \pm desvio padrão; n=6). Cardinal (#) indica diferenças significativas (p<0,05) em relação ao grupo CTRL. Asterisco (*) indica diferenças significativas (t-test; p<0,05) entre ensaios para a mesma dieta. Letras diferentes (a, b, c) significam diferenças significativas (Mann-Whitney; p<0,05) entre dietas para o mesmo ensaio.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Produção em toneladas (t) dos estabelecimentos de aquacultura portugueses, entre 2004 e 2009 (Fonte: INE, 2012).....	10
Tabela II: Descrições e definições atribuídas aos probióticos ao longo dos anos (adaptado de Vasiljevic <i>et al.</i> , 2008).....	13
Tabela III: Resumo dos potenciais probióticos candidatos a agentes de controlo biológico em aquacultura de linguado senegalês (adaptado de Aguirre-Guzman <i>et al.</i> , 2012).	17
Tabela IV: Condições experimentais do ensaio de crescimento.	28
Tabela V – Formulação e composição proximal da dieta basal (%MS, exceto quando indicado).....	29
Tabela VI: Nível de inclusão de probióticos nas dietas testadas e contagens de CFU por quilograma de ração.	30
Tabela VII: Performance de crescimento de juvenis de <i>S. senegalensis</i> quando alimentados com seis dietas experimentais diferentes (85 dias; 19°C; 30‰).....	43
Tabela VIII: Parâmetros morfométricos de juvenis de linguado senegalês alimentados com diferentes dietas durante 85 dias.	43
Tabela IX: Composição proximal das dietas utilizadas no ensaio.	44
Tabela X: Composição proximal das carcaças evisceradas de juvenis de linguado (% ou kJ g ⁻¹ de peso húmido), após 85 dias de suplementação com diferentes combinações de probióticos.	44
Tabela XI: Parâmetros imunológicos (celulares e humorais) após 85 dias de suplementação com diferentes probióticos.	44
Tabela XII: Percentagem de mortalidade e percentagem relativa de sobrevivência (RPS) no ensaio de infeção B (com aclimatização).....	46
Tabela XIII: Cálculo da percentagem de infeção de <i>Phdp</i> para cada uma das concentrações administradas.	81
Tabela XIV: Contagem de CFU de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> preparados para infeção de juvenis.	83

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACH50** – “Alternative Complement Pathway” – Via alternativa do complemento
- AGR** – “Absolute Growth Rate” – Taxa de crescimento absoluto
- CFU** – “Colony forming unit” – Unidade formadora de colónias
- CIIMAR** - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental
- EFSA** – “European Food Safety Authority” - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
- ESB – UCP** – Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
- FAO** – “Food and Agriculture Organization” - Organização para a Alimentação e Agricultura
- DGI** – “Daily Growth Index” – Índice de crescimento diário
- ICBAS** - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
- LANUCE** - Laboratório de Nutrição, Crescimento e Qualidade do Peixe
- LD₅₀** – “Lethal Dose to kill 50% of population” – Dose letal para matar 50% da população
- NO** - “Nitric Oxide” - Óxido nítrico
- PBS** – “Phosphate Buffer Saline” – Tampão fosfato salino
- Pdp11** – *Shewanella putrefaciens*
- Pdp13** – *Shewanella baltica*
- Phdp** – *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
- RaRBC** - “Rabbit Red Blood Cells” – Glóbulos vermelhos do sangue de coelho
- RPS** – “Relative Protection Survival” – Percentagem relativa de sobrevivência
- ROS** – “Reactive Oxygen Species” - Espécies reativas de oxigénio
- SGR** – “Specific Growth Rate” – Taxa de crescimento específico
- WW** – “Wet Weight” – Peso Húmido

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento do tema

Atualmente, o objetivo da aquacultura é maximizar o crescimento, desempenho, eficiência alimentar e resistência dos organismos aquáticos, tendo em conta a redução dos custos na produção por forma a tornar-se uma prática rentável (Denev *et al.*, 2009; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012). Os avanços nas técnicas de cultivo e a introdução de novas espécies têm contribuído para o rápido crescimento da indústria aquícola (Mohapatra *et al.*, 2012).

A intensificação das práticas de aquacultura e da globalização do comércio de pescado exige o cultivo em altas densidades, levando à ocorrência de doenças infecciosas e causando danos significativos no meio ambiente (Burr & Gatlin, 2005; Denev *et al.*, 2009; Mohapatra *et al.*, 2012; Cruz, 2012). Este aumento na produção levou ao uso indiscriminado de desinfetantes e antibióticos que são vertidos nos sistemas de cultivo e que influenciam negativamente o estado sanitário dos animais, reduzindo o crescimento dos peixes e debilitando o seu sistema imunitário, aumentando a contaminação ambiental assim como o desenvolvimento de patógenos com elevada resistência que posteriormente se pode transferir geneticamente (Cunha *et al.*, 2012). Neste contexto, uma das alternativas de controlo microbiano para doenças é o uso de bactérias consideradas probióticas como agentes de controlo (Wang, 2008b).

Além disso a proibição do uso de alguns antibióticos, bem como outras substâncias promotoras de crescimento utilizadas largamente na produção animal, transformou-se num desafio para os produtores. O mercado consumidor está cada vez mais exigente, o que contribui para a procura de medidas alternativas aos antibióticos, sendo os probióticos uma opção viável, prática amiga do ambiente, permitindo melhorar as condições de saúde na criação intensiva de organismos marinhos (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012).

O linguado senegalês (*Solea senegalensis*) é uma espécie com grande potencial de cultivo em Portugal e Espanha, devido ao seu valor comercial e nutricional (Dinis *et al.*, 1999). Contudo, a introdução desta espécie na aquacultura pode ser comprometida devido a problemas patológicos, sendo a mais grave a infeção causada pela bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Arijo *et al.*, 2005; Rigos & Katharios, 2010).

Hoje em dia, é amplamente aceite que as abordagens nutricionais são essenciais para aliviar doenças entre os animais aquáticos de cultura. O conceito de que uma melhor nutrição leva a melhoria de saúde é muito familiar em humanos e também é aplicável em animais aquáticos (Kiron, 2012). O impulso na direção de maior produção e crescimento mais rápido envolveu o reforço ou substituição de alimentos naturais por dietas preparadas (CAN, 1993). As novas estratégias de alimentação e gestão da saúde em peixes de aquacultura proibem da utilização de antibióticos promotores de crescimento. Por conseguinte aumentou a procura por alimentos seguros e promotores naturais de crescimento (Lara - Flores, 2011).

Na aquacultura, a gama de probióticos avaliados para a produção é consideravelmente mais larga do que na agricultura terrestre (Nayak, 2010a). Estando a sua aplicação relacionada com o controlo biológico perante doenças infecciosas, a sobrevivência, o aumento do crescimento, a atividade enzimática, melhores respostas imunológicas frente ao *stress* e uma melhoria da qualidade da água (Ochoa, 2012). Muitos estudos imunológicos foram realizados em vários peixes, usando probióticos diferentes e a sua força para estimular a imunidade dos teleósteos tanto *in vivo* como *in vitro* é notável (Nayak, 2010b).

1.2 Objetivos

Sendo o linguado (*Solea senegalensis*) uma nova espécie na produção aquícola e a utilização de probióticos uma prática cada vez mais usual na aquacultura, neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da suplementação de probióticos (mono ou multi-espécies) no crescimento, mecanismos imunológicos, bem como na resistência ao patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Para estudar as eventuais alterações conferidas pela alimentação suplementada com probióticos os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliação da performance zootécnica e eficiência de utilização alimentar (crescimento específico (SGR), índice de crescimento (DGI), taxa de crescimento absoluto (AGR) e composição corporal proximal);
- ✓ Avaliação da resposta imunológica humoral inata (atividade da via alternativa do complemento (ACH50), atividades da lisozima e da peroxidase). Estimar a atividade da explosão respiratória e a síntese de óxido nítrico através do estudo celular;
- ✓ Avaliação da resposta imuno-inata (a nível humoral) após a infeção com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e a interação desta resposta com o *stress* abiótico causado pela aclimatização ou não dos animais.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquacultura

A aquacultura tem uma longa história, que se iniciou há mais de 2000 anos na China (Wang, 2008b), sendo atualmente a atividade económica mais importante do mundo (CAN, 1993; Balcázar *et al.*, 2006; Díaz-Rosales, 2006; Sahu *et al.*, 2008). Esta atividade compreende todas as formas de cultura de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas em ambientes de água doce, salobra ou marinha (Díaz-Rosales, 2006; Defoirdt *et al.*, 2007).

O peixe é uma fonte vital de alimento para o homem, sendo a maior fonte de proteína de alta qualidade, representando aproximadamente 16% da proteína animal consumida pela população mundial (Sihag & Sharma, 2012). A cultura de produtos aquáticos para consumo e aquariofilia está a crescer e prevê-se que continue a aumentar drasticamente. Esta tendência é resultado do excesso de pesca nas águas de todo o mundo e da procura crescente de produtos aquícolas, o que abre um vasto leque de oportunidades para a indústria aquícola (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012). Segundo o relatório mundial de aquacultura (FAO, 2012) a produção global de peixes de aquacultura cresceu mais de 30% entre 2006 e 2011.

A aquacultura emerge como uma alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado, sendo uma das indústrias de mais rápido crescimento no sector alimentar e também muito lucrativa (Burr & Gatlin, 2005; Rodgers & Furones, 2009; Denev *et al.*, 2009; Cruz, 2012; Mohapatra *et al.*, 2012). A contribuição desta atividade para a produção mundial de alimentos tem aumentado significativamente ao longo das últimas décadas, e este setor agora fornece quase metade do total de peixes, crustáceos e moluscos utilizados para consumo humano (FAO, 2010).

Portugal é o país da União Europeia que consome mais pescado, atingindo um consumo *per capita* de aproximadamente 61,6 kg habitante ano⁻¹ (DGPA, 2007) colocando-o em 3º lugar a nível mundial depois do Japão e da Islândia (FAO, 2010). Com uma localização geográfica privilegiada, sob influência do Oceano Atlântico e do Mar Mediterrâneo, Portugal possui um enorme potencial para a aquacultura.

Nos últimos anos verificou-se um aumento na produção aquícola portuguesa (tabela I), mas Portugal tem uma grande tradição de consumo de pescado, sendo a

produção nacional (pesca e aquacultura) insuficiente para satisfazer os elevados níveis de consumo (DGRM, 2013).

Tabela I: Produção em toneladas (t) dos estabelecimentos de aquacultura portugueses, entre 2004 e 2009 (Fonte: INE, 2012).

Ano	Águas marinhas e salobras	Águas doces	Total
2004	5885	917	6802
2005	5854	845	6699
2006	6947	927	7874
2007	6507	937	7443
2008	7047	941	7987
2009	7043	936	7979

Tradicionalmente, os bivalves representavam a parte mais significativa da produção nacional, mas recentemente espécies piscícolas como o linguado, sargo, tainha e pregado têm vindo a assumir uma importância crescente (INE, 2012).

2.2 Linguado senegalês (*Solea senegalensis*)

A espécie *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) é um Pleuronectiforme, pertencente à família Soleidae, comum no Mediterrâneo e no Atlântico, tornando-se assim uma espécie promissora para o cultivo intensivo em Portugal, visto possuir um elevado valor comercial e encontrar-se adaptada às condições existentes no nosso país (Dinis *et al.*, 1999; Imsland *et al.*, 2003). Além disso esta espécie vem diversificar o mercado aquícola português que se encontra atualmente saturado com a produção de dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Dinis, 1996).

O linguado senegalês (figura 1) é um peixe plano, com um corpo oval, alongado e com dois olhos situados na face dorsal. Atinge a



Figura 1: Linguado senegalês (*Solea senegalensis*).

maturidade sexual aproximadamente aos 3 anos, com cerca de 30 cm de comprimento (Dinis, 1986). Os adultos e juvenis desta espécie são bentónicos, habitam em águas rasas até 100m de profundidade, alimenta-se de pequenos invertebrados bentónicos, principalmente de poliquetas e moluscos bivalves (Whitehead, 1984).

As condições ótimas de cultivo para esta espécie são temperatura 14-26°C, sendo a temperatura ideal 21°C, e a salinidade deve variar entre 25 e 35‰ (Dinis & Reis, 1995). Esta espécie tem grande sucesso em sistemas fechados de recirculação, com fotoperíodo semelhante ao natural. Os tanques ideais para engorda são jangadas pouco profundas, de cor escura ou clara (espécie com grande capacidade de mimetismo) e a uma densidade máxima de 15-25 kg m⁻² (Howell *et al.*, 2006).

A aquacultura desta espécie é relativamente recente e foi necessário superar algumas dificuldades para que o seu cultivo fosse viável, nomeadamente estudar a formulação de uma dieta adequada aos seus requisitos nutricionais da espécie de forma a obter melhores resultados de crescimento. Vários autores já demonstraram que o linguado tem capacidade de se adaptar a diferentes dietas. Diversos estudos confirmam que esta espécie utiliza eficientemente dietas com elevados níveis de proteína de origem vegetal (Silva *et al.*, 2010; Cabral *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Cabral *et al.*, 2013). Noutros trabalhos também foi demonstrado que esta espécie tolera diferentes níveis lipídicos (Borges *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2013).

2.3 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

A bactéria halofílica (gram negativa) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (anteriormente conhecida como *Pasteurella*) é responsável por elevadas perdas na aquacultura, sendo frequentemente reportada em novas espécies aquícolas (Rigos & Katharios, 2010). Desde os anos 90 tem causado grandes perdas económicas na cultura de dourada (*Sparus aurata*), robalo (*Dicentrarchus labrax*), linguado (*Solea senegalensis* e *Solea solea*) nos países mediterrânicos da Europa e robalo (*M. saxatilis* e *M. chrysops*) nos EUA (Toranzo *et al.*, 1991; Romalde *et al.*, 1999; Magariños *et al.*, 2001; Arijo *et al.*, 2005).

Zorrilla *et al* (1999) reportou pela primeira vez a infeção de *Pasteurella* em linguado senegalês cultivado no sudoeste de Espanha, causando frequentemente mortalidades elevadas.

Conhecida também como pseudotuberculose ou pasteurelose, esta septicémia bacteriana é caracterizada pela presença de nódulos brancos em vários órgãos internos (principalmente no rim e baço) (Toranzo *et al.*, 1991). Esta doença caracteriza-se por variações patológicas. Na forma crónica os animais infetados possuem estruturas

esbranquiçadas, semelhantes a tubérculos, nos órgãos internos (0,5-3,5 mm de diâmetro). Na forma aguda, observa-se necrose multifocal no fígado, baço e rim, e aglomerados bacterianos, livres e no interior dos fagócitos, nos capilares e nos espaços intersticiais (Romalde *et al.*, 1999). Nos animais infetados os sinais externos são geralmente imperceptíveis, não ocorrendo lesões óbvias à superfície do corpo. Contudo alguns animais infetados exibem uma cor escura, hemorragias na cabeça e barbatanas e por vezes distensão abdominal pela acumulação de líquido ascídico (Romalde *et al.*, 1999; Ochoa, 2012; Zorrilla *et al.*, 1999; Austin & Austin, 2007). Os linguados infetados, normalmente não aparentam lesões externas, exceto uma pigmentação mais escura na pele e um inchaço na cavidade abdominal. Em alguns casos podem observar-se algumas hemorragias, pequenas úlceras na pele e a palidez nas branquias. Internamente os animais infetados apresentam o fígado e rim com uma coloração mais clara e os típicos tubérculos brancos de 1-2 mm de diâmetro no baço (Zorrilla *et al.*, 1999).

A doença ocorre principalmente durante os meses de verão e tem sido associada a altas temperaturas, baixa salinidade e má qualidade da água (Romalde *et al.*, 1999; Austin & Austin, 2007). Taxas de elevadas mortalidades estão associadas a temperaturas superiores a 20°C, abaixo dessa temperatura os peixes podem acolher o patogénico como uma infeção subclínica por longos períodos de tempo (Magariños *et al.*, 2001; Romalde *et al.*, 1999).

2.4 Probióticos

2.4.1 Definição de probiótico

Probiótico é um termo relativamente novo, utilizado para nomear os microrganismos que estão associados a efeitos benéficos para o hospedeiro (Corcionivosch *et al.*, 2010). Mas o uso de probióticos não é uma novidade, estes são utilizados desde a antiguidade, primeiro em humanos, animais terrestres e mais recentemente na aquacultura (Ochoa, 2012).

O termo probiótico significa "para a vida" e é derivado da língua grega (Schrezenmeir & de Vrese, 2001). A sua definição tem mudado ao longo do tempo (tabela II) (Bruhn, 2006), devido ao maior conhecimento científico e melhor

compreensão da sua relação entre a saúde intestinal e bem-estar geral (Lee & Salminen, 2009; Verschuere *et al.*, 2000).

Tabela II: Descrições e definições atribuídas aos probióticos ao longo dos anos (adaptado de Vasiljevic *et al.*, 2008).

Ano	Descrição	Autores
1953	Os probióticos estão em alimentos vegetais (vitaminas, substâncias aromáticas, enzimas e outras substâncias) ligadas aos processos vitais.	Kollath
1954	Probióticos são o oposto de antibióticos.	Vergin
1955	Efeitos deletérios dos antibióticos podem ser prevenidos pela terapia probiótica.	Kolb
1965	Um agente microbiológico que estimula o crescimento de outros organismos.	Lilly e Stillwell
1971	Extratos de tecidos que estimulam o crescimento microbiano.	Sperti
1973	Compostos para construir resistência à infecção no hospedeiro, mas não inibir o crescimento de microrganismos <i>in vitro</i> .	Fujii e Cook
1974	Organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal (primeiro uso do termo “probiótico” para descrever um suplemento alimentar).	Parker
1992	Suplemento alimentar microbiano que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o seu equilíbrio microbiano.	Fuller
1992	Um ou mais indivíduos numa cultura mista de microrganismos que, aplicada em animais ou no homem, têm um efeito benéfico sobre o hospedeiro, melhorando as propriedades da microflora indígena.	Havenaar e Huis
1996	Culturas vivas de “micróbios” ou produtos lácteos cultivados, que influenciam benéficamente a saúde e nutrição do hospedeiro.	Salminen
1996	Microrganismos que após a ingestão de um determinado número, exercem benefícios à saúde além da nutrição básica inerente.	Schaafsma
1999	Preparações de células microbianas ou componentes de células microbianas que têm um efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro.	Salminen, Ouwehand, Benno and Lee
2000	Adjuvante microbiano vivo que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, modificando a comunidade microbiana ou ambiente, assegurando uma melhor utilização da ração ou aumento o seu valor nutricional, aumentando a resposta do hospedeiro para a doença, ou uma melhoria da qualidade do seu ambiente circundante.	Verschuere <i>et al</i>
2001	A preparação de um produto viável que contenha microrganismos em número suficiente, que alterem a microflora (por implantação ou colonização) num compartimento do hospedeiro e porque exercem efeitos benéficos à saúde nesta série.	Schrezenmeir e Vrese
2002	Microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro.	FAO/OMS

Os avanços no uso de probióticos em bovinos e medicina humana levaram a considerar a sua aplicação na aquacultura, como alternativa na luta contra as infeções microbianas (Sakai, 1999). No entanto, em sistemas de aquacultura a interação entre a microbiota e o hospedeiro não é limitada ao trato digestivo, e dado o facto de a água abrigar comunidades microbianas, seria certo a utilização de uma definição distinta de probióticos, para animais aquáticos (Merrifield *et al.*, 2010).

A primeira aplicação empírica de probióticos em aquacultura foi em 1986, quando Kozasa utilizou esporos de *Bacillus toyoi* como aditivo para aumentar a taxa de crescimento de *Seriola quinqueradiata* (Wang, 2008b; Cruz, 2012).

Em 1991, Porubcan documentou a utilização de *Bacillus* sp., para testar a capacidade de aumento da produtividade de *Penaeus monodon* e assim melhorar a qualidade da água (Cruz, 2012). Assim sendo, devido ao crescente interesse de probióticos na aquacultura, Moriarty (1998) sugeriu que a definição de probiótico deveria incluir a ocorrência natural de bactérias nos tanques e lagoas em que os animais vivem. Passando assim a ser designados: “aditivos microbianos vivos que beneficiam a saúde dos hospedeiros e, portanto, aumentam a produtividade” (Wang, 2008b; Moriarty *et al.*, 2005; Nayak, 2010b; Cruz, 2012).

Se estivéssemos a agregar todas as definições propostas na área da aquacultura, probiótico é um componente vivo, morto ou de uma célula microbiana que, quando administrada através da alimentação ou na água onde se encontra o hospedeiro, melhora a resistência a doenças, o estado de saúde, o crescimento, a utilização do alimento ou a resposta ao *stress* em geral, o que é conseguido, pelo menos em parte, por meio de melhoramento do equilíbrio microbiano dos hospedeiros ou do meio ambiente (Merrifield *et al.*, 2010).

2.4.2 Probióticos utilizados em práticas aquícolas

Vários probióticos, mono ou multi-espécies, estão a ser estudados para aplicação em práticas aquícolas (Ahmadvand *et al.*, 2011). A maioria dos probióticos propostos, pertence às bactérias ácido lácticas, algas unicelulares, leveduras ou aos géneros: *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, ou *Flavobacterium* (Verschuere *et al.*, 2000; Wang, 2008b; Rigos & Katharios, 2010). Segundo Rigos & Katharios (2010), todos os benefícios esperados das estirpes estudadas dependem de muitos fatores como a espécie, água utilizada (salobra, marinha ou doce), estado do cultivo (larva, juvenil ou adulto) e sistema de cultivo (fluxo contínuo, recirculação, tanques ou jaulas).

Muitos relatórios publicados têm demonstrado efeitos positivos na utilização de probióticos na alimentação de várias espécies (Denev *et al.*, 2009). Mas embora a quantidade de publicações nos últimos anos relacionadas com probióticos tenha

aumentado, ainda é necessária informação vital e central, portanto são indispensáveis métodos mais avançados para avaliar as mudanças na composição da flora intestinal e da sua interação mútua com o metabolismo de animais aquáticos (Zhou & Wang, 2012).

Os benefícios observados e descritos para a suplementação com probióticos, em animais aquáticos incluem: a) Melhoria no valor nutricional dos alimentos; b) Contribuição para a digestão enzimática; c) Inibição de agentes patógenos (competição por nutrientes e sítios de adesão); d) Promoção de fatores de crescimento; e) Melhoria da resposta imunitária; f) Melhoria na qualidade da água; g) Atividade antiviral (Sahu *et al.*, 2008; Azevedo & Braga, 2012).

O uso de probióticos na aquicultura foi relacionado com a eficácia comprovada na microflora intestinal resultando numa melhoria do estado de saúde. Dois mecanismos principais foram sugeridos:

1. O efeito nutricional, caracterizado pela redução de reações metabólicas que produzem substâncias tóxicas, a estimulação das enzimas nativas e produção de vitaminas e de substâncias antimicrobianas;
2. O efeito de saúde ou sanitário distingue-se pelo aumento da resistência à colonização, a competição para a aderência da superfície do intestino e a estimulação da resposta imunitária (Anadón *et al.*, 2006).

Atualmente é amplamente aceite o uso de probióticos microbianos em aquicultura (Wang, 2008b). O grande interesse do uso destes microrganismos na aquicultura tem sido gerado, em parte, pela ênfase dada pela FAO para promover uma melhor saúde entre os peixes de viveiro através de estratégias alternativas e amigas do ambiente, evitando o uso de antibióticos (Kiron, 2012). Os probióticos ajudam na eficiência de conversão alimentar, crescimento e conferem proteção contra agentes patógenos, por exclusão competitiva de locais de adesão, e também melhoram as respostas fisiológicas e imunológicas dos peixes (Nayak, 2010a). Outras vantagens descritas são a redução dos níveis de azoto e fósforo, controlo de amónia, nitritos e outros sulfuretos de hidrogénio, bem como o seu papel significativo na decomposição de matéria orgânica (Wang, 2008b), efeito sobre a tolerância ao *stress* e melhoria da reprodução (Cruz, 2012).

O estudo dos probióticos benéficos para o crescimento e defesa contra alguns patógenos no linguado senegalês ainda é muito recente. Na tabela III estão referenciados os principais probióticos estudados como agentes de controle biológico em aquacultura de linguado (*S. senegalensis*).

Os probióticos podem ser administrados na água, na ração ou alimentos vivos (artémia e rotíferos), mas aparentemente, o sucesso de adesão ao trato gastrointestinal é maior quando disponibilizados na alimentação (Irianto & Austin, 2002). Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos vários métodos para administrar suplementos probióticos em alimentos animais, incluindo pastilhas, cápsulas, pastas, pós e grânulos. A forma em que o probiótico é administrado depende do uso pretendido para o produto, frequência de administração e também do tipo de animal a ser doseado. A dose recomendada de cada microrganismo varia entre produtos, devido à força da ação potencial do probiótico e às limitações na produção industrial. As doses indicadas normalmente variam entre 1×10^8 - 1×10^{10} CFU de bactérias por kg de ração (Charalampopoulos & Rastall, 2009).

A limitação mais importante para o uso de probióticos em aquacultura é, em muitos casos, serem viáveis na ração por curtos períodos de tempo, sendo necessário adicionar regularmente e em concentrações elevadas (Defoirdt *et al.*, 2007). As restrições verificadas na produção de probióticos úteis para a aquacultura devem-se à débil pesquisa, por parte das empresas, sobre como fazer o produto especificamente para aquacultura e também devido à incapacidade de produção em larga escala e quantidades comerciais (Nwachi, 2013).

Tabela III: Resumo dos potenciais probióticos candidatos a agentes de controlo biológico em aquacultura de linguado senegalês (adaptado de Aguirre-Guzman *et al.*, 2012).

Probiótico	Origem	Administração	Dose	Efeitos	Referência
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Pdp11)	<i>S. aurata</i>	Na ração	10^8 CFU g ⁻¹	Reduz a adesão de <i>V. harveyi</i> à pele (muco) e intestino, melhorando a sobrevivência	Chabrillón <i>et al.</i> (2005)
<i>Vibrio sp. e Shewanella sp.</i>	<i>S. senegalensis</i>	a) Na água de cultivo b) Metanúplios de artémia	a) $2 - 6 \times 10^4$ cél. mL ⁻¹ b) $8 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ cél. mL ⁻¹	Ambos os probióticos aumentaram a sobrevivência das larvas	Makridis <i>et al.</i> (2008)
Pdp 11 e <i>Shewanella baltica</i> (Pdp13)	<i>S. aurata</i>	Na ração	10^9 CFU g ⁻¹	Promovem o crescimento e aumentam a sobrevivência contra <i>Phdp</i>	Díaz-Rosales <i>et al.</i> (2009)
Pdp11 e Pdp13	<i>S. aurata</i>	Na ração	10^9 CFU g ⁻¹	Efeito positivo no crescimento e na funcionalidade intestinal	Sáenz de Rodrigáñez <i>et al.</i> (2009)
Pdp11 e Pdp13	<i>S. aurata</i>	Na ração	10^9 CFU g ⁻¹	Ambos os probióticos conferem proteção contra <i>Phdp</i>	García de la Banda <i>et al.</i> (2010)
PB1 - <i>Bacillus sp.</i> , <i>Pedococcus sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> PB2 - <i>Pedococcus acidilactici</i>	Produtos comerciais	Na ração	PB1 – $4,6 \times 10^6$ CFU kg ⁻¹ PB2 – $8,6 \times 10^5$ CFU kg ⁻¹	Ambos os probióticos mostraram ter capacidade para regular a expressão de genes relacionados com o sistema imune inato	Batista <i>et al.</i> (2013)
A - <i>Bacillus sp.</i> , <i>Pedococcus sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i> e <i>Lactobacillus sp.</i> B - <i>Pedococcus acidilactici</i>	Produtos comerciais	Na ração	A – $1,0$ e $4,6 \times 10^6$ CFU kg ⁻¹ B – $3,5$ e $8,6 \times 10^5$ CFU kg ⁻¹	A utilização do probiótico multi-espécies a $1,0 \times 10^6$ CFU kg ⁻¹ pode aumentar a proteção contra o agente patogénico e aumentar a absorção de nutrientes	Batista <i>et al.</i> (2014)

2.4.2.1 Regulamentação Europeia

Ao longo das duas últimas décadas tem-se verificado um interesse renovado nas propriedades de promoção da saúde através de microrganismos. Isto resultou na produção de inúmeros produtos comerciais de probióticos, destinados tanto para o consumo humano como para uso na alimentação animal (Wright, 2005), assim como num esforço considerável para selecionar estirpes que pudessem suprimir de forma mais eficiente os patógenos em peixes (Ziggers, 2011).

A utilização de medicamentos antimicrobianos, nomeadamente antibióticos, para promoção do crescimento, foi proibida na União Europeia (UE) a 1 de Janeiro de 2006. Devido à preocupação em particular com os animais de criação intensiva, visto mostrarem um maior risco de contrair doenças gastrointestinais sendo ainda a utilização de antibióticos uma oportunidade para aumentar a resistência das bactérias patogénicas (Charalampopoulos & Rastall, 2009; De Baets *et al.*, 2009). Esta proibição tem despertado um interesse crescente na utilização de probióticos.

A comercialização de probióticos como aditivos para alimentação animal é submetido a um processo de aprovação complexo. Na união europeia, o uso de aditivos na alimentação de animais está bem regulamentado, sendo a utilização de probióticos conferida pelo Regulamento (CE) N° 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho. Neste regulamento estabelecem-se as regras para a autorização, uso, monitorização, rotulagem e embalagem de aditivos para alimentação animal. Os microrganismos probióticos estão incluídos na categoria “Aditivos zotécnicos – qualquer aditivo utilizado para influenciar favoravelmente o rendimento de animais saudáveis ou para influenciar favoravelmente o ambiente”.

Antes de receber a aprovação para comercialização no mercado os probióticos são sujeitos a uma rigorosa avaliação. Para poder comercializar um probiótico as indústrias têm de obter uma autorização da European Food Safety Authority (EFSA), entidade que controla os efeitos benéficos de probióticos sobre animais e segurança da saúde humana e do meio ambiente (Desriac *et al.*, 2010). Atualmente para um microrganismo ser autorizado como aditivo para alimentação animal tem que obedecer as medidas propostas no Regulamento (CE) N° 429/2008 do Concelho. Este

regulamento contém as orientações específicas para a preparação e apresentação de pedidos à avaliação e autorização de aditivos destinados à alimentação animal.

Hoje em dia, a espécie *Pediococcus acidilactici* (CNCM MA 18/5M) é a única autorizada como aditivo na ração comercial de salmonídeos e camarões na União Europeia (UE). A sua autorização está descrita no Regulamento (CE) n° 911/2009 da Comissão sendo a empresa detentora da autorização a Lallemand SAS. Segundo este regulamento a dose recomendada é 3×10^9 CFU kg⁻¹ e 1×10^9 CFU kg⁻¹ de alimento completo para animais, para salmonídeos e camarões, respetivamente.

2.4.2.2 Critérios de seleção de um agente probiótico

Na aquacultura a seleção de estirpes probióticas é um processo bastante complexo, uma vez que o habitat microbiano está sujeito a constantes alterações, o que permite trocas na composição estrutural e funcional das comunidades microbianas devido à sua interação com o meio ambiente (Verschuere *et al.*, 2000). Algumas pesquisas sugerem que os probióticos devem ser selecionados a partir do próprio hospedeiro, em que vão ser utilizados, para desta forma minimizar os efeitos provocados pelas diferenças entre ambientes, no entanto existem trabalhos que demonstraram que bactérias isoladas de outros hospedeiros também podem ter efeitos benéficos na saúde dos peixes (Gatesoupe, 2008).

De uma forma geral, os critérios a seguir para a seleção de microrganismos de forma a serem considerados como potenciais agentes probióticos são os seguintes: possuir efeito antagónico frente a diferentes patógenos (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto & Austin, 2002); resistência ao pH e bÍlis (Ochoa, 2012); inocuidade, a estirpe probiótica deve estar isenta de patogenidade e não deve prejudicar o recetor (Irianto & Austin, 2002) e capacidade de aderir as células intestinais (Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006).

Os aditivos microbianos regulados pelo Regulamento (CE) n ° 1831/2003 e de acordo com as orientações anteriores são submetidos a uma avaliação de segurança detalhada com a intenção de assegurar que são inofensivos para animais-alvo, usuários e consumidores. Particular atenção é focada sobre a presença de marcadores de resistência a antibióticos transmissÍveis, e o potencial para a produção de metabolitos prejudiciais (Anadón *et al.*, 2006).

2.4.2.3 Mecanismos de ação dos probióticos

O modo de ação dos probióticos ainda está a ser caracterizado em qualquer animal, incluindo peixes (Nayak, 2010a) (figura 2). Mas o conhecimento relativo aos probióticos tem aumentado, podendo considerar-se como um antónimo de antibiótico, pois estes microrganismos têm um efeito antimicrobiano através da modificação da microbiota intestinal, secreção de substâncias antibacterianas, competindo com os patógenos tanto na adesão ao intestino, como pelos nutrientes necessários para a sobrevivência do patógeno e contribuindo para a melhoria da qualidade da água (Sahu *et al.*, 2008; Ochoa, 2012; Cruz, 2012).

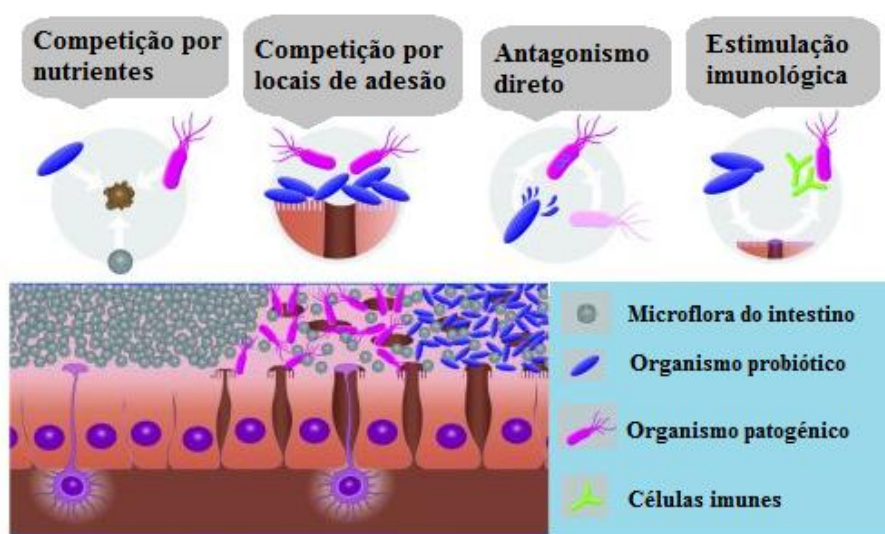


Figura 2: Mecanismos de ação dos probióticos em animais (adaptado de Protexin (2013)).

O efeito benéfico das bactérias probióticas depende da sua capacidade de fixação ao lugar específico onde vão atuar. A competência destas estirpes para exercer uma ação protetora no hospedeiro está relacionada com os seus diferentes mecanismos de ação, estes são avaliados tanto *in vitro* como *in vivo*:

1. Produção de compostos inibidores – as bactérias probióticas têm um efeito antimicrobiano, produzindo compostos como bacteriocinas, lisozimas, peróxidos de hidrogénio e ácidos orgânicos de cadeia curta que levam à alteração do pH (Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006), estes compostos são inibitórios para outros microrganismos (Sahu *et al.*, 2008).
2. Competições por locais de adesão – os organismos probióticos competem com os patógenos pelos sítios de adesão e nutrientes na microbiota intestinal, evitando deste modo a sua colonização. Assim, o estabelecimento na microbiota

é um componente chave para promover a saúde dos animais (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010). A habilidade para a adesão e posterior colonização das bactérias probióticas na mucosa intestinal forma a primeira barreira de defesa contra a proliferação das bactérias patogênicas invasoras.

3. Melhoria da qualidade da água – Muitos estudos relatam a melhoria da qualidade da água nos sistemas de cultivo quando se utilizam estirpes probióticas, estas são um fator importante para converter a matéria orgânica em CO₂ (Cruz, 2012; Sahu *et al.*, 2008).
4. Contribuição para a digestão enzimática – está descrito na bibliografia que os probióticos têm um efeito benéfico nos processos digestivos dos animais aquáticos, as algas, leveduras e estirpes probióticas melhoram o crescimento, sobrevivência e a assimilação de nutrientes (Sahu *et al.*, 2008).
5. Aumento da resposta imuno-inata – Existem vários trabalhos que demonstram que o sistema inate de peixes e crustáceos pode ser estimulado por bactérias probióticas (Nayak, 2010a; Sakai, 1999). Estes compostos aumentam a resposta defensiva do hospedeiro, fazendo com que os animais estejam mais preparados e resistam melhor a infecções causadas por vírus, bactérias, fungos ou parasitas.

2.5 Sistema imunológico dos peixes

O sistema imunitário dos peixes é semelhante ao dos vertebrados superiores, apresentando no entanto algumas diferenças cruciais. Os peixes são organismos de vida livre, desde que nascem, estando a sua sobrevivência dependente da eficácia do seu sistema imunológico (Uribe *et al.*, 2011). Por essa razão, a resposta inata torna-se mais importante do que a resposta adquirida (Saurabh & Sahoo, 2008). Sendo a capacidade de reconhecer a presença de agentes patogênicos essencial. A resposta imuno-inata inclui fatores humorais solúveis (muco, proteínas, lisozima, complemento etc), sendo nos peixes a principal barreira defensiva contra os agentes patogênicos. A segunda linha de defesa é a imunidade adquirida, podendo ser celular e/ou humoral, com base numa série de modificações adaptativas que ocorrem dentro das populações linfóides (linfócitos T e B) (Ochoa, 2012).

2.5.1 Resposta imune inata

A resposta imunológica inata (natural ou não-específica) inclui todos os mecanismos de defesa que protegem o organismo contra a infecção, sem depender da exposição anterior a quaisquer agentes patogénicos. Na defesa inata a resposta é relativamente rápida, sendo executada em primeiro lugar pelos fatores solúveis e pela resposta fagocitária de neutrófilos e macrófagos (Ellis, 1999), impedindo assim os agentes patológicos de se fixarem. As células fagocitárias são fundamentais na defesa do hospedeiro, impedindo ou limitando a propagação e/ou o crescimento dos organismos infecciosos. Os macrófagos são células com grande capacidade de fagocitose e que devido à sua distribuição, por todos os tecidos do hospedeiro, asseguram uma prevenção contínua. Os neutrófilos estão presentes no sangue e órgãos hematopoiéticos, sendo células de reserva dedicadas à resposta imune, podendo atuar rapidamente quando ocorre uma infecção (Magnadottir, 2006). Os dois subconjuntos dos mecanismos da imunidade inata (humoral e celular) não funcionam de forma isolada, e cooperaram em muitos casos no exercício das suas funções.

2.5.1.1 Resposta celular

A defesa não específica é geralmente dividida em três partes: a barreira epitelial/mucosa, os parâmetros humorais e os componentes celulares. A barreira epitelial constituída pela mucosa da pele, brânquias e trato alimentar e é uma barreira extremamente importante nos peixes (Magnadottir, 2010).

As respostas celulares da defesa específica incluem células especializadas, capazes de matar e digerir os patógenos, quando estes conseguem ultrapassar as barreiras físicas (Aoki *et al.*, 2008).

2.5.1.1.1 Explosão respiratória

Logo que um patógeno invade os tecidos do peixe é desencadeada uma resposta imunológica bastante complexa, iniciando-se a fagocitose das bactérias pelos macrófagos e neutrófilos. A fagocitose está associada a um maior consumo de oxigénio molecular por parte das células imunes envolvidas, designando-se este fenómeno por explosão respiratória, havendo assim a produção de compostos reativos de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*). Durante a explosão respiratória, tanto macrófagos

como neutrófilos produzem ROS, que têm propriedades bactericidas e desempenham um papel muito importante na destruição dos agentes patógenos invasores (Ellis, 2001).

2.5.1.1.2 Óxido nítrico

Outro mecanismo de defesa dos macrófagos é a produção de óxido nítrico (NO – *Nitric Oxid*), esta molécula é utilizada em todo o reino animal, como agente tóxico para organismos infecciosos ou de sinalização entre as células (Coleman, 2001). Além destas funções fisiológicas o NO é gerado durante as respostas imunes e inflamatórias, sendo produzido normalmente em resposta a citocinas ou parasitas. A citotoxicidade do NO é um mecanismo antimicrobica, atribuído inicialmente aos macrófagos, mas há estudos que confirmam que os neutrófilos também podem produzir NO (Magnadottir, 2006). As células que produzem NO desempenham um papel muito importante na defesa celular contra algumas infecções virais, parasitárias e bacterianas (Tafalla & Novoa, 2000).

O NO pode também induzir ou regular a morte e a função das células do sistema imunológico, regulando assim a imunidade específica. De igual modo pode atuar como um agente anti-inflamatório ou imunossupressor, através dos seus efeitos inibitórios ou apoptose em células (Coleman, 2001).

2.5.1.2 Resposta humoral

Peixes teleósteos possuem substâncias não-específicas de defesa humoral que, apesar de demonstrar similaridade funcional com as observadas em mamíferos, têm uma série de características diferentes (Whyte, 2007). Os fatores humorais (mecanismos de defesa não específicos) encontram-se livres nos fluidos corporais, e são predominantemente proteínas ou glicoproteínas, que incluem lisozima, peroxidase, anti-proteases, os componentes da cascata do complemento, citocinas, quimosinas, anticorpos naturais e péptidos antibacterianos, que destroem e inibem não especificamente o crescimento dos agentes infecciosos (Aoki *et al.*, 2008; Alvarez-Pellitero, 2008; Whyte, 2007; Magnadottir, 2006).

2.5.1.2.1 Atividade alternativa do complemento

Nos peixes teleósteos o sistema do complemento desempenha um papel muito importante na resposta imune adaptativa, este sistema envolve 20 a 30 proteínas do

plasma e vários recetores (Holland & Lambris, 2002). O sistema do complemento dos peixes teleósteos pode ser ativado através de três vias de complemento:

- Via clássica - desencadeada pela ligação do anticorpo à superfície celular, ou diretamente por vírus, bactérias e células infetadas por vírus;
- Via alternativa - é independente do anticorpo e ativada diretamente por microrganismos estranhos;
- Via das lectinas - inicia-se com a ligação da lectina de ligação aos resíduos de manose (ou outro tipo de açúcares) presentes na superfície dos agentes patogénicos (Secombes, 1996; Holland & Lambris, 2002).

Todas as três vias convergem para a via lítica, levando a opsonização ou eliminação direta (lise ou fagocitose) do microrganismo (Nayak, 2010a; Uribe *et al.*, 2011).

2.5.1.2.2 Atividade da lisozima

A lisozima é uma enzima glicosídica produzida por neutrófilos e monócitos/macrófagos, a ação bactericida desta enzima envolve a hidrólise de peptidoglicano da parede celular de bactérias, resultando na lise celular (Caruso *et al.*, 2011). A lisozima está presente no muco, tecido linfóide, plasma (soro) e outros fluidos corporais da maioria das espécies de peixes (Magnadóttir *et al.*, 2005). Esta enzima possui propriedades antibacterianas especialmente sob bactérias gram-positivas, mas também em algumas gram-negativas, parasitas e vírus (Secombes, 1996; Uribe *et al.*, 2011; Magnadóttir *et al.*, 2005). Além disso, esta enzima é conhecida por possuir atividade lítica contra bactérias e poder ativar o complemento e fagócitos (Magnadóttir, 2006; Alvarez-Pellitero, 2008).

2.5.1.2.3 Atividade da peroxidase

A peroxidase é uma enzima muito importante na defesa imune, pois utiliza os radicais oxidativos para produzir ácido hipocloroso e assim matar os agentes patogénicos (Nayak, 2010a).

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Este estudo foi realizado sob a supervisão de um especialista experiente e credenciado, em animais de laboratório e ciências veterinárias, pela Autoridade Veterinária Portuguesa (1005-1092, DGV-Portugal, FELASA, categoria C), de acordo com a diretiva europeia 2010/63/CE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos.

O ensaio experimental de crescimento decorreu na sala de nutrição do Laboratório de Nutrição, Crescimento e Qualidade do Peixe (LANUCE), localizada no Biotério de Organismos Aquáticos (BOGA), pertencente ao Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Porto, Portugal.

3.1.1 Quarentena e Aclimatização dos animais

Antes da chegada dos peixes procedeu-se à ativação química dos biofiltros, introduzindo-se uma mistura de cloreto de amónia, carbonato de cálcio e di-amonio hidrogenofosfato à água do sistema, tendo em atenção a carga de peixes a introduzir.

Os juvenis de linguado (*S. senegalensis*) foram obtidos na piscicultura Aquacria Piscícolas S.A., localizada na Torreira (Aveiro, Portugal). Antes do início do ensaio de crescimento, o lote inicial de 750 juvenis foi mantido num tanque de quarentena de 2000 L (Figura 3a) durante 15 dias. Durante esse período foram alimentados com ração comercial, três vezes ao dia, num total de 1,5% do seu peso vivo. Diariamente foram monitorizados os parâmetros físicos e químicos da água e mantidos abaixo dos limites recomendados para espécies marinhas. Durante o período de quarentena a temperatura foi mantida nos $17 \pm 1^\circ\text{C}$ e oxigénio dissolvido $> 90\%$ (Oxímetro - Hanna Instruments, Europa); salinidade: $25 \pm 1\text{‰}$ (Refratómetro – TMC, V²) e amónia e nitritos $< 1\text{mg L}^{-1}$ (Fotómetro – Palintest, Inglaterra). Quando necessário procedeu-se à troca parcial da água do tanque. Após 8 dias de quarentena os juvenis foram sujeitos a 3 dias consecutivos de banhos profiláticos (figura 3b) com formaldeído a 37% (Merck) durante 3 horas, para evitar a manifestação de possíveis patologias. Durante todo o processo de desinfeção os juvenis foram mantidos com bastante arejamento (10 mg L^{-1}).

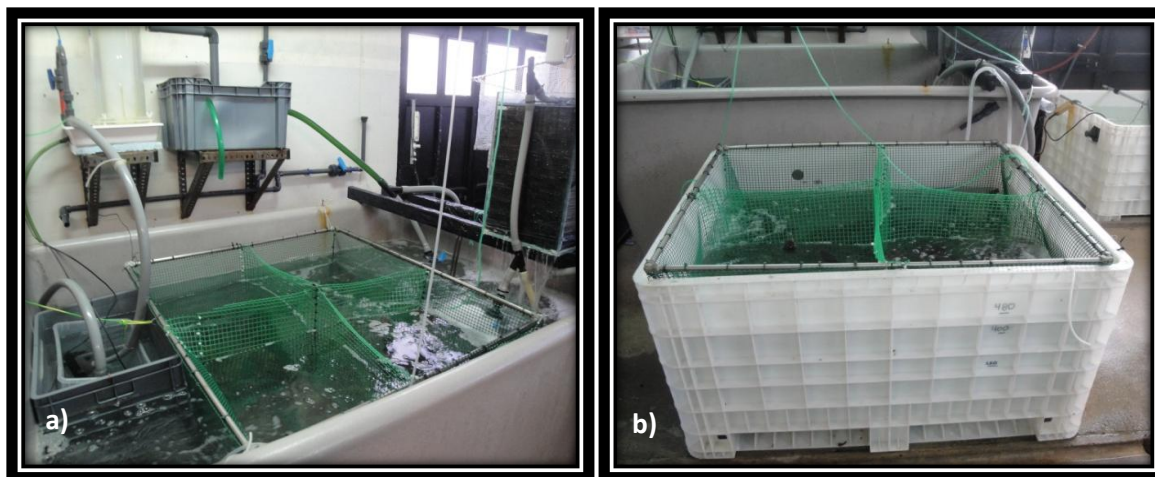


Figura 3: a) Sistema de quarentena; b) Tanque utilizado para os banhos profiláticos.

3.1.2 Ensaio de crescimento

Após o período de quarentena 520 peixes foram distribuídos aleatoriamente por 18 tanques retangulares de fibra de vidro de 50L ($50 \times 35 \text{ cm} = 0,175 \text{ m}^2$), onde permaneceram durante 12 dias em aclimatização (figura 4). Na tabela IV estão enunciadas as condições em que foram mantidos os juvenis, durante o ensaio de crescimento. Os parâmetros da água foram monitorizados durante todo o ensaio e mantidos com níveis dentro dos limites recomendados para a espécie.



Figura 4: Tanques retangulares (50L) utilizados no ensaio de crescimento.

Tabela IV: Condições experimentais do ensaio de crescimento.

Condição	
Nº inicial de peixes	28
Peso inicial	$16,07 \pm 0,11 \text{ g}$
Densidade inicial	$7,7 \text{ Kg m}^{-2}$
Fluxo de entrada de água	2 L min^{-1}
Temperatura	$19 \pm 1^\circ\text{C}$
Salinidade	$30 \pm 1\%$
Fotoperíodo	12h escuro: 12h dia
Período de ensaio	85 dias

O sistema de abastecimento de água era fechado de recirculação, sendo a filtração assegurada pelos métodos mecânicos: UV (Sera, UV-C 55W, Heinsberg, Alemanha), escumador (Aqua Medic, Turbofloter 5000), ozonizador (TMC, V²-O³ozone) e a filtração biológica: biofiltros e filtros de areia (AstralPool, Millennium, New Jersey, USA). O fornecimento de oxigénio manteve-se constante durante todo o

ensaio, sendo distribuído por um difusor em cada tanque e também nos tanques reservatórios de água. Durante o ensaio de crescimento a alimentação foi efetuada com alimentadores automáticos três vezes ao dia.

3.1.2.1 Dietas experimentais

Durante doze semanas foi realizado o ensaio de crescimento, testando cinco combinações de bactérias que foram previamente isoladas do trato intestinal de linguado senegalês. Estas bactérias foram estudadas e selecionadas *in vitro* como sendo as que apresentaram maiores potencialidades probióticas e evidenciando atividade antimicrobiana contra várias estirpes patogénicas que normalmente afetam o linguado senegalês. Este estudo e seleção foi realizado pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB - UCP).

As bactérias probióticas incorporadas nas dietas deste trabalho foram isoladas de linguado senegalês pelo grupo da ESB - UCP, num trabalho prévio também realizado no âmbito do projeto PROBIOSOLEA (os resultados deste trabalho serão publicados posteriormente).

A dieta basal (tabela V) utilizada neste ensaio foi formulada segundo os requisitos nutricionais do linguado (54% proteína bruta, 18% gordura bruta, 22 kJ g⁻¹ energia bruta). Na tabela VI encontram-se descritas as 6 dietas testadas (diferentes probióticos e concentrações). Na preparação das dietas seguiram-se as normas ISO 6887-1:1999, ISO-7218: 2007 e ISO 6498:2012 referentes à preparação de amostras para microbiologia de alimentos e alimentação de animais para animais.

As dietas foram preparadas pela empresa Sparos S.A.. A dieta basal foi preparada por extursão com temperatura controlada, obtendo-se *pellets* com uma granulometria de 1,5-2 mm. Após a extursão foram adicionados os probióticos nas

Tabela V – Formulação e composição proximal da dieta basal (%MS, exceto quando indicado).

Ingredientes	% MS
Farinha de peixe 70 LT	18,5
Farinha de peixe 60%	25
CPSP 90%	2,5
Farinha de lula	2,5
Farinha de soja	5
Soycomil PC	6,2
Farinha de ervilha (Lysamine GP)	10
Farinha de trigo	7,3
Gluten de milho	5
Óleo de peixe	9,3
Vitaminas & Minerais Premix 1%	1
Di-calcio fosfato	1,5
Aquatex 8071	5
Ligante (Kilseghur)	1
Composição proximal (%MS)	
Matéria seca	91,7
Proteína bruta	53,5
Gordura bruta	17,8
Cinzas	13
Energia bruta (Kj g ⁻¹)	21,8

concentrações desejadas, resultando em 6 dietas distintas. Estas foram guardadas á temperatura ambiente, durante a noite, sem serem sujeitas a qualquer tipo de tratamento térmico de secagem. No decorrer de todo o ensaio as rações foram armazenadas em sacos de vácuo, no frigorífico (4°C) até serem utilizadas.

Tabela VI: Nível de inclusão de probióticos nas dietas testadas e contagens de CFU por quilograma de ração.

Probiótico	Dietas experimentais (CFU Kg ⁻¹ ração)					
	CTRL	PB ₁	PB ₂	PB ₃	PB ₄	PB ₅
<i>Shewanella</i> sp.	–	5,13×10 ¹¹	–	2,53×10 ¹¹	–	2,53×10 ¹¹
<i>Enterococcus</i> sp.	–	–	6,50×10 ¹⁰	–	–	4,33×10 ¹⁰
<i>Arthrobacter</i> sp.	–	–	–	1,22×10 ¹¹	1,22×10 ¹¹	1,22×10 ¹¹
<i>Pseudomonas</i> sp.	–	–	–	–	2,33×10 ¹¹	–

Ao longo do ensaio foi efetuado um controlo da quantidade/qualidade dos probióticos introduzidos nas dietas. Antes da incorporação nas dietas, determinou-se a concentração dos mesmos, por contagem em placas de TSA (Tryptic Soy Agar). Após a incorporação, foi novamente confirmada a concentração de cada probiótico em cada dieta. No caso particular do probiótico *Shewanella hafniensis*, esta bactéria teve que sofrer uma inativação pelo calor (1h a 60°C), de modo a atingir da concentração desejada. Além disso efetuou-se um estudo prévio onde foi possível determinar que a viabilidade das bactérias utilizadas não era influenciada pelo armazenamento da ração durante 4 semanas quando refrigeradas (4°C). Estes estudos foram realizados pelo grupo da ESB – UCP.

3.1.2.2 Determinação de parâmetros zootécnicos e morfométricos

No final do ensaio de crescimento foram determinados os seguintes parâmetros zootécnicos:

- Taxa de crescimento específico (SGR) - esta expressão assume que o aumento de peso é ajustado a uma função exponencial. O valor obtido exprime a percentagem de aumento de peso por dia durante todo o período experimental. Esta taxa é útil para a comparação do crescimento em períodos relativamente curtos (Engrola *et al.*, 2007).

$$SGR (\% \text{ dia}^{-1}) = \frac{[LN(\text{peso final } (g)) - LN(\text{peso inicial}(g))]}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}} \times 100$$

- Índice de crescimento diário (DGI) - supõe-se que o crescimento é proporcional à massa corporal elevado à potência de 2/3. Este coeficiente permite uma melhor comparação das taxas de crescimento, uma vez que varia pouco quer a massa corporal seja 1 g ou vários quilos, embora o expoente deva ser adaptado para cada caso.

$$DGI (g \text{ dia}^{-1}) = \frac{(\text{peso inicial } (g))^{1/3} - (\text{peso final } (g))^{1/3}}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}}$$

- Taxa de crescimento absoluto (AGR) - esta medida indica o aumento médio de peso durante o período experimental, embora não dê nenhuma informação sobre a forma como esse aumento ocorreu.

$$AGR (g \text{ dia}^{-1}) = \frac{\text{peso final } (g) - \text{peso inicial } (g)}{n^{\circ} \text{ dias da experiência}}$$

- Índice de condição (K) – permite avaliar se os animais estão a crescer de forma proporcional, ou se pelo contrário apenas estão a ganhar peso, mas não crescem em comprimento. Pode ocorrer quando há um gasto energético muito elevado, levando ao aumento do tamanho do fígado ou outros tecidos. Também pode ocorrer o inverso, quando há uma deficiente ingestão de energia e o índice de condição reduz-se (Sáez, 2011).

$$K(\%) = \frac{\text{peso final}}{\text{comprimento final}^3} \times 100$$

- Índice hepatossomático (IH) – indica que existe uma correta proporção entre o tamanho do fígado e o tamanho do peixe.

$$IH(\%) = \frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso corporal}} \times 100$$

3.1.3 Ensaios de infeção com *Phobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Os ensaios decorreram no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP), Porto, Portugal. Em todos os ensaios efetuados, os animais foram mortos e manipulados de acordo com a legislação europeia e portuguesa, para o uso de animais em experimentação e/ou com outros fins científicos.

3.1.3.1 *Agente patogénico*

Utilizou-se nesta experiência a estirpe de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* PC566.1 (*Phdp*), esta foi gentilmente cedida pelo Dr. Benjamín Costas (CIIMAR, Universidade do Porto, Portugal) e isolado de *Solea senegalensis* (Espanha) pela professora Alicia E. Toranzo (Departamento de Microbiologia y Parasitología, Faculdade de Biología da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha).

Em condições assépticas, na câmara de fluxo laminar (Telstar, Bio II Advance, Espanha) a bactéria foi descongelada e repicada para meio TSA (Tryptic Soy Agar, VWR) suplementado com 1,5% de NaCl e colocada a crescer a 22°C (Estufa – Binder KB 53, Tuttingen, Alemanha) durante 48 horas. Após incubação a bactéria foi repicada para frascos TSB estéril (Tryptose Soy Broth, Fluka – Sigma Aldrich) suplementado com 1,5% NaCl e mantidos na estufa a 22°C *overnight* em agitação contínua (100 rpm). Posteriormente as bactérias foram centrifugadas durante 30 minutos (3500 rpm a 4°C) (Centrifuga – Eppendorf, Modelo 5430R), sendo o *pellet* ressuspensão em HBSS 1× estéril (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco) e ajustado às concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL⁻¹. Para confirmar as concentrações bacterianas dos inóculos fez-se o plaqueamento de diluições seriadas das suspensões em placas de TSA e contagem do número de CFU após incubação por 48h a 22°C (resultados não apresentados).

3.1.3.2 *Determinação da dose letal (LD₅₀)*

LD₅₀ representa o número de bactérias necessárias para que ocorra a mortalidade de 50% dos peixes inoculados com a bactéria (Rico *et al.*, 2008). Para determinar o LD₅₀ foi realizado um ensaio específico nas instalações cedidas pelo ICBAS. Grupos de 10 peixes (13-16 g de peso corporal) foram mantidos em tanques cúbicos com 50L de água a 19°C, salinidade 30‰ em sistema fechado individual. Os juvenis foram infetados por injeção via intraperitoneal, com 0,1 mL de suspensão de agente patogénico em solução salina seriada de 10^3 , 10^4 e 10^5 CFU mL⁻¹, o mesmo número de peixes foi inoculado com HBSS 1× e utilizados como grupo controlo. Os peixes inoculados foram observados diariamente ao longo de um período de 14 dias e a mortalidade foi monitorizada e registada.

3.1.3.3 Ensaios de infecção (A e B) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Nestes ensaios foram utilizados 12 tanques circulares com 63 L de água salgada (Figura 5a), mantidos em sistema de circuito fechado para cada um dos tanques.

Foram realizados 2 ensaios de infecção com *Phdp*, no primeiro (ensaio A) os animais foram transportados para novas instalações e no mesmo dia foram infetados (sem aclimatização). No segundo ensaio (ensaio B) os juvenis foram transportados para as novas instalações, mantiveram-se em aclimatização por 8 dias e só depois foram infetados com *Phdp*. Procedeu-se à infecção por injeção intraperitoneal com 0,1 mL da suspensão bacteriana a uma concentração inferior ao LD₅₀ determinado anteriormente (anexo I) no grupo de peixes infetados e no grupo de peixes placebo foi injetado com 0,1 mL de HBSS 1× estéril.

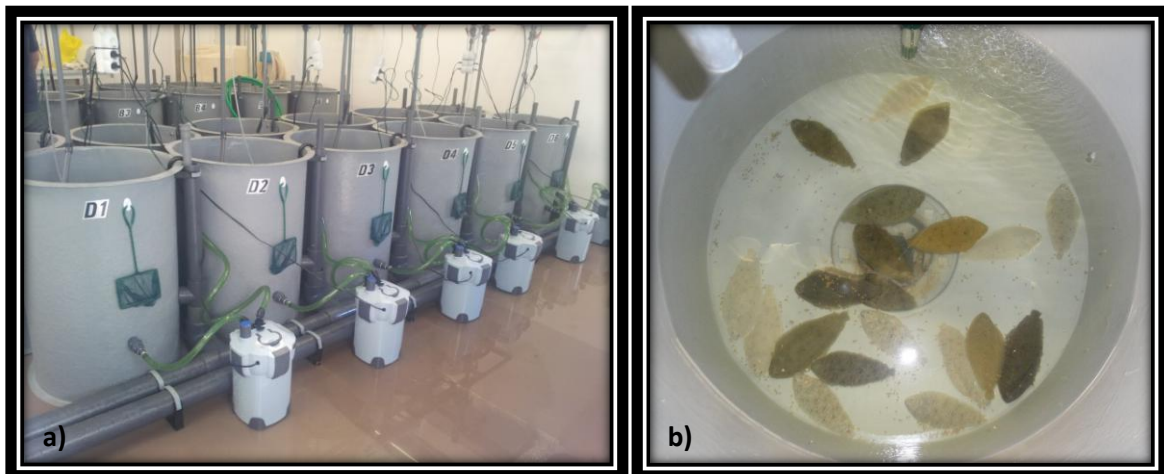


Figura 5: a) Tanques circulares (63L) utilizados nos ensaios de infecção com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. b) Juvenis a serem alimentados.

Ao longo dos ensaios de infecção com *Phdp* os juvenis foram alimentados à mão 2 vezes ao dia até à saciedade aparente. Ambas as experiências decorreram durante 14 dias. A percentagem relativa de sobrevivência (RPS) foi calculada para avaliar o potencial protetor incitado pelo probiótico (Díaz-Rosales *et al.*, 2009).

$$RPS = \left[1 - \left(\frac{\% \text{ mortalidade de peixes alimentados com probiótico}}{\% \text{ mortalidade dieta CTRL}} \right) \right] \times 100$$

No terceiro dia após a infecção, sacrificaram-se seis peixes de cada tanque para recolher plasma, utilizado posteriormente na análise dos parâmetros humorais.

Aos animais que iam morrendo era feita uma análise microbiológica dos seus órgãos, nomeadamente, rim e fígado. O procedimento desta análise foi efetuado na câmara de fluxo laminar, tendo-se procedido à dissecação do animal (Figura 6a). Efetuou-se uma incisão na cavidade abdominal, tendo em atenção para não destruir nenhum órgão, ficando a cavidade abdominal exposta podendo-se efetuar, assim, a análise microbiológica. Para o efeito esterilizou-se uma ansa à chama com o auxílio de uma lamparina e após o seu arrefecimento introduziu-se no órgão. De seguida inoculou-se o tecido em caixas de Petri estéreis contendo TSA, que foram incubadas a 22°C por um período de 48h (Figura 6b).

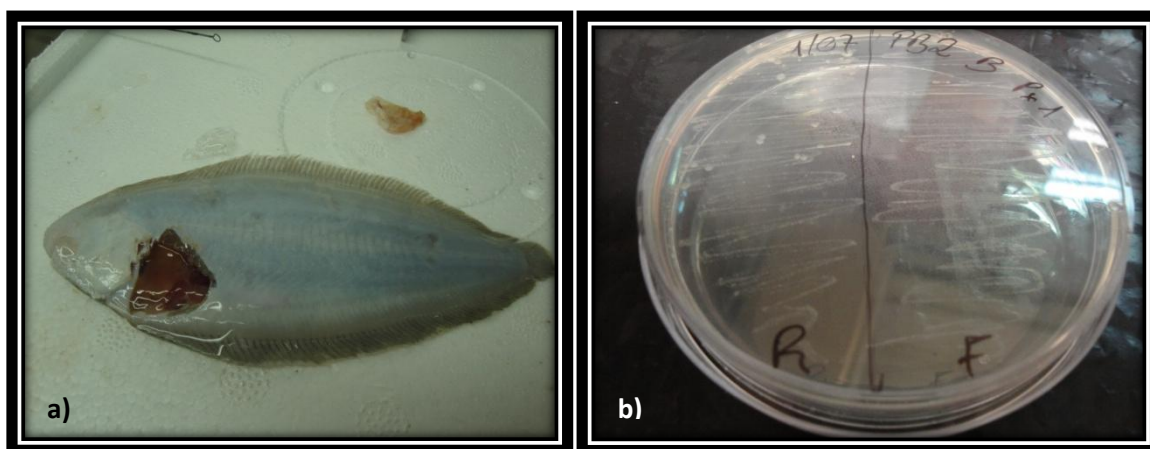


Figura 6 – a) *Solea senegalensis* dissecado para realização da análise microbiológica dos órgãos; b) Placa de TSA com inóculo das bactérias isoladas dos órgãos de linguado senegalês.

As mortalidades foram consideradas como sendo devido à infeção quando a estirpe bacteriana foi isolada em cultura pura a partir de órgãos internos (fígado e rim) do peixe morto (análise realizada pelo grupo da ESP - UCP).

3.2 Resposta Imunológica Inata

Para determinar a resposta imunológica foram amostrados 6 peixes por tratamento em cada ensaio (crescimento e infeções A e B com *Phdp*), sendo recolhido para estas análises plasma e macrófagos do rim cranial. Os peixes foram anestesiados com MS-222 (Tricaine Methanesulfonate, Sigma-Aldrich) a uma concentração de 200 mg L⁻¹ imediatamente antes de iniciar o procedimento, sendo cada peixe amostrado individualmente, de modo a evitar *stress* devido à manipulação.

3.2.1 Recolha de plasma e macrófagos do rim cranial

O sangue foi coletado (figura 7a) com uma seringa heparinizada de 1 mL (B. Braun Medical, Queluz de Baixo, Portugal) da veia caudal e guardado em gelo até ser centrifugado (2000g, 10 min, 4°C). O plasma recolhido foi congelado a -80°C (Panasonic, MDF-U5386S) para posterior utilização.

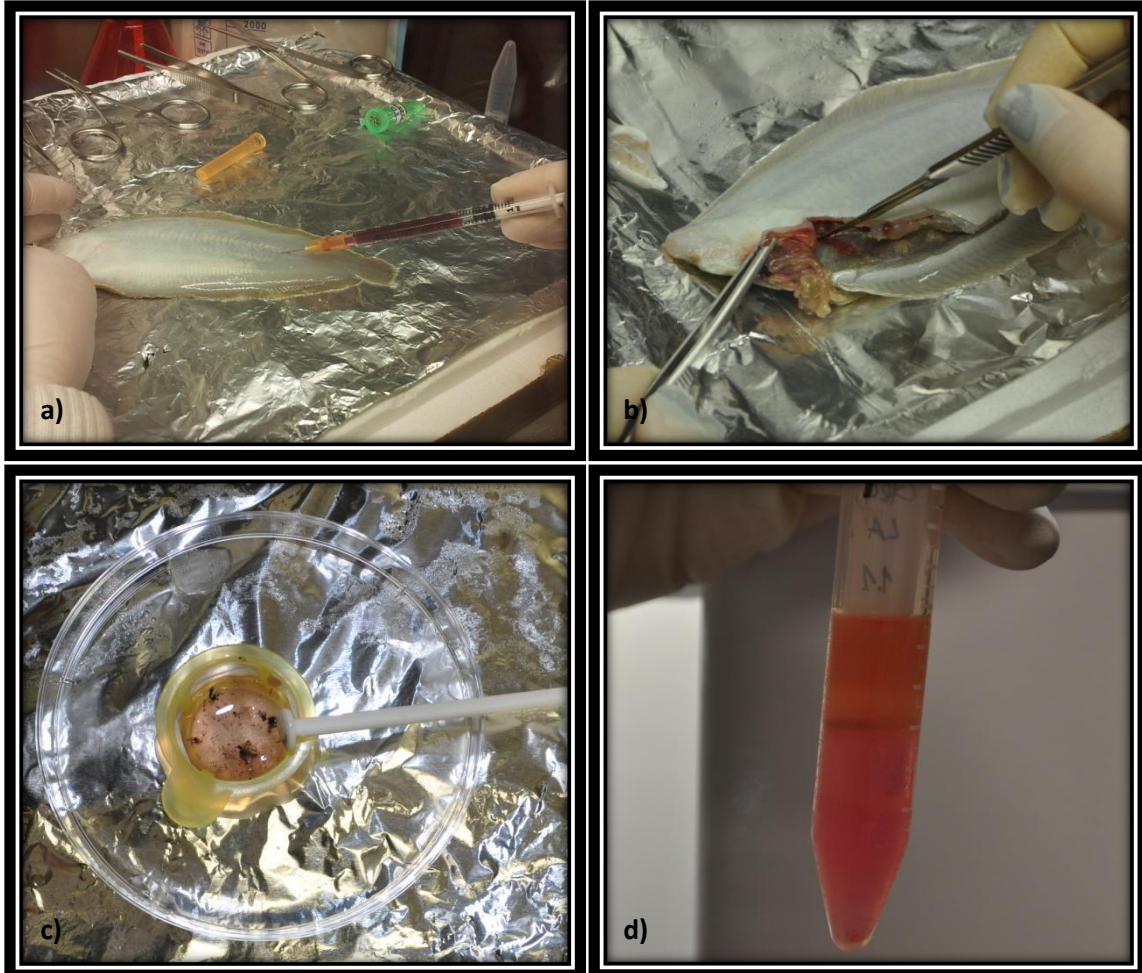


Figura 7 – a) Recolha de sangue, para posterior análise dos parâmetros humorais; b) Recolha do rim cranial em condições assépticas para análise dos parâmetros celulares; c) Maceração do rim para recolha de leucócitos; d) Anel de leucócitos na interface do gradiente de Percoll.

Para a recolha dos leucócitos do rim anterior utilizou-se o método descrito por Secombes (1990). Em condições assépticas (figura 7b), na câmara de fluxo laminar, recolheu-se o rim cranial, macerando-o suavemente sob uma rede de *nylon* de 100 μm (figura 7c) usando meio Leibovitz (L15, Gibco) suplementado com penicilina (100 IU mL^{-1}), estreptomicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), heparina (20 unidades mL^{-1}) e 2% de FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) (L15 2 %).

A suspensão de células obtida foi colocada num gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) 34/51% e centrifugada (400g; 40 minutos a 4°C), recolheu-se o anel de leucócitos (figura 7d) e este foi ressuspensão em L15 Leibovitz com 0,1% de FBS (L15 0,1%). Ajustou-se a suspensão a uma concentração de 2×10^7 células mL^{-1} com L15 0,1% e as células foram distribuídas por placas estéreis de 96 poços de fundo plano (Sarstedt, Alemanha), 100 μL por poço e incubadas *overnight* a 18°C.

3.2.2 Parâmetros imuno celulares

3.2.2.1 Explosão respiratória (ROS)

No ensaio da explosão respiratória utilizou-se um método de quantificação da redução do ferrocitocromo C pelo anião superóxido (O^{2-}) extracelular (Secombes, 1990). A camada aderente de células foi lavada com HBSS 1 \times (Sigma-Aldrich) e foi adicionado a cada poço 100 μL da suspensão da solução de ferrocitocromo C a 2 mg mL^{-1} (Cytochrome C from Equine Heart; Sigma-Aldrich) e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PMA (Phorbol Myristate Acetate; Sigma-Aldrich), e um controlo negativo constituído pela solução de ferrocitocromo C, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PMA e 300 unidades mL^{-1} de SOD (Superoxide Dismutase; Sigma-Aldrich) para comprovar a especificidade da reação. As placas foram lidas no espectrofotómetro (BioTek Instruments Inc., Mod – Powerwave 340, Vermont, USA) a 550 nm, 30 minutos após a adição dos reagentes às células. As densidades óticas foram convertidas para nmol de O^{2-} multiplicando os valores obtidos por 15,87 como descrito por Pick (1986). A contagem total de células foi determinada após o ensaio de explosão respiratória através da remoção do meio e da adição de 100 mL de tampão de lise (0,1 M de ácido cítrico, 1% de Tween 20 e 0,05% de violeta de cristal). Após 2 minutos os núcleos foram contados ao microscópio numa câmara de Neubauer, todos os resultados foram expressos em 10^3 células mL^{-1} .

3.2.2.2 Óxido nítrico (NO)

O ensaio de produção de óxido nítrico pelos leucócitos do rim anterior foi realizado pelo método descrito por Neumann *et al.* (1995) e modificado por Tafalla & Novoa (2000). Este método baseia-se na reação de Griess (Green *et al.*, 1982) que quantifica o conteúdo em nitritos no sobrenadante dos leucócitos, dado que o óxido nítrico é uma molécula instável que se degrada em nitritos e nitratos.

Para estimular os leucócitos do rim anterior para a produção de óxido nítrico a camada aderente de células foi exposta a LPS (lipopolissacarídeo) de *Escherichia coli* serótipo 0111:B4 (10 µg mL⁻¹; Sigma-Aldrich) e foram ainda estimulados com LPS (10 µg mL⁻¹) e N^G-Methyl-L-arginina (1 mM; Sigma-Aldrich) para confirmação de especificidade da reação. Após 72 horas de incubação a 18°C, foram retirados 50 µL dos sobrenadantes dos leucócitos, que se colocaram em novas placas de 96 poços e adicionou-se 100 µL de solução de sulfanilamida (1%; Sigma-Aldrich) e 100 µL de solução de NED (0,1 %; N-naphthyl-ethylene-diamine; Sigma-Aldrich). Após 5 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz, foi medida a absorvância a 540 nm. A concentração dos nitritos das amostras foi determinada a partir da curva padrão, gerada por concentrações conhecidas de nitrato de sódio (Merck). Também no final deste ensaio foi necessário determinar o número total de células utilizadas, os resultados foram expressos por 10³ células mL⁻¹.

3.2.3 Parâmetros imuno humorais

Os parâmetros imunológicos analisados nas infecções com *Phdp* foram expressos como índice de estimulação, este foi calculado como a razão entre a absorvância obtida pelos fagócitos dos peixes alimentados com as diferentes dietas experimentais e absorção de peixes alimentados com a dieta controle (sem suplementação de probióticos).

3.2.3.1 Atividade da lisozima

A atividade da lisozima foi medida utilizando um ensaio de turbimetria tal como descrito por Ellis (1990) e modificado por Wu *et al.* (2007). Numa microplaca de 96 poços de fundo plano (Sarstedt, Alemanha) foram colocados 15 µL de plasma e de seguida adicionou-se 250 µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg mL⁻¹; Sigma-Aldrich). Elaborou-se uma curva padrão com a lisozima HEWL (Hen Egg White Lysozyme; Sigma-Aldrich) utilizando as concentrações 20 µl mL⁻¹ a 0,0049 µl mL⁻¹. Procedeu-se á leitura no espectrofotómetro a uma absorvância de 450nm, após 0,5 e 4,5 minutos. Tendo em conta que uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de plasma que causa a redução na absorvância de 0,001 unidades por minuto.

3.2.3.2 Atividade da peroxidase

A atividade total da peroxidase no plasma foi medida seguindo o procedimento descrito por Quade & Roth (1997). Resumidamente foram diluídos 15 μL de plasma em 135 μL de HBSS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (Gilbo) em placas de 96 poços de fundo plano. De seguida juntou-se 50 μL de TMB (10 mM; 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride hydrate; Sigma-Aldrich) e 50 μL de peróxido de hidrogénio (5 mM; Sigma-Aldrich). A reação foi interrompida após a mudança de cor (2 minutos), por adição de 50 μL de ácido sulfúrico (2 M; Sigma-Aldrich) e a densidade óptica foi lida a 450 nm. A atividade da peroxidase (unidades mL^{-1} plasma) foi determinada pela definição de que uma unidade de peroxidase produz uma alteração da absorvância de uma unidade na densidade óptica.

3.2.3.3 Atividade alternativa do complemento

A atividade da via alternativa do complemento do plasma (ACH50) foi estudada através da adaptação do método de Sunyer *et al.* (1995) e utilizando glóbulos vermelhos de sangue de coelho (RaRBC; Probiologica). As células de RaRBC foram lavadas em soro fisiológico (0,9%; Sigma-Aldrich), sendo centrifugadas (2000 g, 5 min., a 4°C) e ressuspendas em tampão teste (pH 7,3): contendo 0,1% de Gelatina (Fluka), 5Mm de Barborato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,13 mM de Cloreto de sódio (Merck), 10 Mm de Cloreto de magnésio hexahidratado (VWR) e 10 mM de EGTA (Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether) - N,N,N',N'-tetraacetic acid; Sigma-Aldrich). No final da lavagem, ajustou-se a uma concentração de $2,8 \times 10^8$ células $^{-1}$ mL de RaRBC. De seguida, numa placa de 96 poços de fundo redondo foram adicionados 10 μL de plasma diluídos sequencialmente em tampão teste e adicionados 10 μL da suspensão de RaRBC. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 100 minutos, com agitação contínua na placa de agitação (Edmund Buhler, Mod – KM2). A reação foi cessada por adição de 150 μL de tampão STOP (pH 7,3) contendo todos os reagentes utilizados para o tampão teste exceto o Cloreto de magnésio hexahidratado e EGTA, que foram substituídos pelo EDTA (20 mM; Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate; Sigma-Aldrich). As amostras foram então centrifugadas (122g, 2,5 min., 4°C) e a extensão da hemólise foi estimada através da medição da densidade óptica do sobrenadante a 414 nm. Os valores máximos de hemólise (100%) foram determinados adicionando 10 μL de RaRBC a 40 μL de água destilada e a homólise mínima

(espontânea) pela adição de 10µL de RaRBC a 40µL de tampão teste. As unidades de ACH50 foram definidas como a concentração do plasma que proporciona 50% de hemólise de RaRBC.

3.3 Análises Químicas – Composição proximal

Foi realizada a análise da composição química das carcaças evisceradas dos animais e da ração fornecida ao longo deste ensaio. Os peixes amostrados de cada tanque foram triturados numa picadora (Udex S.A., Maia, Portugal) de modo a obter amostras homogêneas (figura 8). Nas carcaças determinou-se imediatamente o seu teor em humidade e cinzas, em triplicado, nas amostras ainda em fresco. Seguidamente procedeu-se à liofilização das amostras (3 dias), para a realização das análises posteriores. A ração foi apenas moída numa trituradora (IKA, Modelo A 11 B, Staufen, Alemanha) antes de realização das análises químicas.



Figura 8: Carcaças de linguados trituradas.

Para cada amostra (carcaças e ração), determinou-se em duplicado, a composição proximal, segundo os procedimentos padrão (AOAC, 2006):

- Matéria seca - determinada pela variação de peso antes e após secagem na estufa (Binder KB 53, Tuttingen, Alemanha) a 105°C até obtenção de um peso constante.

$$\% \text{ MS} = \frac{[\text{Peso final do cadinho com amostra}] - [\text{Peso do cadinho vazio}]}{\text{Peso fresco da amostra}} \times 100$$

Determinou-se também a percentagem de humidade da amostra:

$$\text{Humidade} = 100 - \% \text{ MS}$$

- Cinzas - calculada pela variação de peso antes e após incineração na mufla (Noberterm L9/11/B170; Bremen, Alemanha) a 500°C durante 5h.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{[\text{Peso final do cadinho com amostra}] - [\text{Peso do cadinho vazio}]}{\text{Peso inicial da amostra}} \times 100$$

- Proteína bruta - obtida a partir da determinação do teor de azoto por combustão total no analisador de azoto (Leco Corporation, modelo FP-528, St Joseph, USA).

$$\% \text{ Proteína (\%MS)} = \frac{\text{valor \% Proteína obtido}}{\% \text{ MS}}$$

- Gordura bruta - determinada pela extração com éter de petróleo (40-60°C) pelo método de Soxhlet (FOSS Soxtec 2055, Suzhou, China).

$$\% \text{ Gordura (\%MS)} = \frac{[\text{Peso final do copo com amostra}] - [\text{Peso inicial do copo}]}{\text{Peso inicial amostra} \times \% \text{ MS}} \times 100$$

- Energia bruta - determinada por combustão na bomba calorimétrica adiabática IKA (Werke C2000; IKA, Staufen, Alemanha).

$$\text{Energia } \text{kJ g}^{-1} (\% \text{MS}) = \frac{\text{Energia (kJ g}^{-1}\text{)}}{\% \text{ MS}}$$

3.4 Estatística

Para o tratamento estatístico dos dados utilizaram-se os métodos descritos por Zar (1999), usando o software IBM SPSS Statistics versão 20, para Windows (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Os dados foram submetidos a uma análise de homogeneidade de variância (teste de Levene) e a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk). No caso de cumprimento destes pressupostos, procedeu-se ao teste de ANOVA a 1 fator (dieta) ou 2 fatores (dieta**stress*). Havendo diferenças significativas procedeu-se ao teste post-hoc Tukey. Quando os pressupostos não foram atendidos, efetuou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e em caso de haver diferenças significativas fez-se uma análise pelo teste Mann-Whitney.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

4.1 Ensaio de crescimento

4.1.1 Parâmetros zootécnicos e morfométricos

A performance de crescimento e os parâmetros morfométricos, dos juvenis de linguados, alimentados com diferentes dietas experimentais durante o ensaio de crescimento (85 dias) apresentam-se nas tabelas VII e VIII. Apenas se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no peso corporal final, entre a dieta CTRL e as dietas PB₂ e PB₄. Em relação aos restantes parâmetros avaliados, não foram afetados pela suplementação com probióticos.

Tabela VII: Performance de crescimento de juvenis de *S. senegalensis* quando alimentados com seis dietas experimentais diferentes (85 dias; 19°C; 30‰).

Parâmetro	CTRL	PB ₁	PB ₂	PB ₃	PB ₄	PB ₅
Peso Inicial (g)	16,14 ± 0,28	16,05 ± 0,27	16,04 ± 0,27	16,10 ± 0,26	16,11 ± 0,25	16,01 ± 0,26
Peso Final (g)	26,56 ± 0,63 ^a	24,45 ± 0,53 ^{ab}	22,91 ± 0,53 ^b	24,96 ± 0,60 ^{ab}	24,03 ± 0,48 ^b	24,05 ± 0,54 ^{ab}
SGR (% dia ⁻¹)	0,58 ± 0,04	0,49 ± 0,07	0,41 ± 0,06	0,52 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,50 ± 0,03
DGI (g dia ⁻¹)	0,53 ± 0,04	0,45 ± 0,07	0,37 ± 0,06	0,47 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,45 ± 0,03
AGR (g dia ⁻¹)	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01

Os valores representam a média ± erro padrão (n = 3). Para peso inicial n = 84 e para peso final n ≥ 76. Diferentes letras em expoente indicam diferenças significativas entre dietas ($p < 0,05$) para o mesmo parâmetro.

Quanto aos parâmetros morfométricos avaliados, índice de condição (K) e índice hepatossomático (IH), não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no final do ensaio de crescimento. Mesmo não existindo diferenças significativas entre tratamentos, os valores mais elevados, em ambos os parâmetros morfométricos foram na dieta PB₅.

Tabela VIII: Parâmetros morfométricos de juvenis de linguado senegalês alimentados com diferentes dietas durante 85 dias.

Parâmetro	CTRL	PB ₁	PB ₂	PB ₃	PB ₄	PB ₅
K (%)	1,19 ± 0,04	1,17 ± 0,03	1,09 ± 0,02	1,15 ± 0,03	1,13 ± 0,04	1,20 ± 0,03
IH (%)	1,24 ± 0,03	1,16 ± 0,14	1,25 ± 0,08	1,17 ± 0,03	1,21 ± 0,03	1,26 ± 0,04

Os valores representam a média ± erro padrão. Para K (%) n = 18 e para IH (%) n = 6. A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

4.1.2 Composição proximal

4.1.2.1 Dietas e carcaças

Realizou-se a análise da composição química das dietas (tabela IX), sendo estas isoenergéticas (21,8 kJ g⁻¹ de ração), isoproteicas (55%) e isolipídicas (17%). A tabela X apresenta a composição química das carcaças dos juvenis alimentados com as dietas em estudo, ao longo de 85 dias. Não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) nos

parâmetros avaliados. Apesar de não se observarem diferenças significativas na composição das carcaças, a dieta PB₂ foi a que depositou menor percentagem de gordura (3,93 ± 0,38 % WW) e maior percentagem de proteína (17,23 ± 0,51% WW).

Tabela IX: Composição proximal das dietas utilizadas no ensaio.

Composição (% MS)	CTRL	PB ₁	PB ₂	PB ₃	PB ₄	PB ₅
Matéria seca (%)	93,66 ± 0,08	92,70 ± 0,08	91,55 ± 0,02	93,21 ± 0,08	92,53 ± 0,11	92,60 ± 0,01
Cinzas	14,29 ± 0,10	14,41 ± 0,09	14,47 ± 0,08	14,28 ± 0,08	14,32 ± 0,06	14,34 ± 0,01
Energia (kJ g⁻¹)	21,69 ± 0,01	21,63 ± 0,21	21,88 ± 0,04	21,80 ± 0,01	21,91 ± 0,03	21,90 ± 0,06
Gordura bruta	16,62 ± 0,08	16,83 ± 0,04	16,98 ± 0,11	17,02 ± 0,17	17,08 ± 0,40	17,03 ± 0,10
Proteína bruta	56,34 ± 2,38	54,65 ± 0,18	54,95 ± 0,32	54,81 ± 0,07	54,74 ± 0,10	54,74 ± 0,06

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 2). A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos (p>0,05).

Tabela X: Composição proximal das carcaças evisceradas de juvenis de linguado (% ou kJ g⁻¹ de peso húmido), após 85 dias de suplementação com diferentes combinações de probióticos.

Composição (% WW)	CTRL	PB ₁	PB ₂	PB ₃	PB ₄	PB ₅
Matéria seca (%)	22,67 ± 1,34	23,28 ± 1,03	23,89 ± 0,79	23,95 ± 1,32	23,99 ± 0,79	24,37 ± 0,90
Humidade	74,95 ± 0,81	75,89 ± 1,22	75,13 ± 0,44	74,70 ± 0,34	75,23 ± 0,49	74,48 ± 0,15
Cinzas	2,64 ± 0,29	2,82 ± 0,34	3,13 ± 0,19	3,24 ± 0,51	2,93 ± 0,08	2,80 ± 0,20
Energia (kJ g⁻¹)	5,86 ± 0,17	5,58 ± 0,33	5,63 ± 0,17	5,90 ± 0,19	5,67 ± 0,21	5,95 ± 0,08
Gordura bruta	5,14 ± 0,48	4,37 ± 0,75	3,93 ± 0,38	4,80 ± 0,20	4,49 ± 0,59	4,82 ± 0,19
Proteína bruta	17,45 ± 0,60	17,23 ± 0,51	18,20 ± 0,40	17,93 ± 0,44	17,59 ± 0,15	18,09 ± 0,13

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 3). A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos (p>0,05).

4.1.3 Parâmetros Imunológicos

Nos parâmetros imunológicos (celulares e humorais) não se observaram quaisquer diferenças significativas (p>0,05) entre as dietas experimentais (tabela XI).

Tabela XI: Parâmetros imunológicos (celulares e humorais) após 85 dias de suplementação com diferentes probióticos.

	CTRL	PB ₁	PB ₂	PB ₃	PB ₄	PB ₅
Parâmetros Celulares						
NO - Nitrito (µM)	6,93 ± 0,45	6,89 ± 0,33	6,92 ± 0,45	6,88 ± 0,33	6,90 ± 0,32	6,95 ± 0,38
ROS (nmolesO₂⁻)	0,32 ± 0,21	0,33 ± 0,18	0,53 ± 0,32	0,74 ± 0,29	0,41 ± 0,19	0,86 ± 0,46
Parâmetros Humorais						
ACH50 (EU mL⁻¹)	15,00 ± 1,03	12,30 ± 4,63	16,77 ± 7,79	10,72 ± 5,76	11,92 ± 5,45	10,18 ± 3,94
Lisozima (EU mL⁻¹)	1401,85 ± 693,81	2510,19 ± 1314,55	1422,22 ± 1138,52	2031,48 ± 1386,56	1692,13 ± 1127,72	1693,53 ± 485,12
Peroxidase (Uni. mL⁻¹)	90,30 ± 22,99	52,92 ± 22,99	47,01 ± 15,18	55,13 ± 33,45	67,60 ± 33,45	38,68 ± 10,82

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 6). A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos (p>0,05).

4.2 Ensaios de infecção com *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*

4.2.1 Determinação do LD₅₀

Para se realizarem os ensaios de infecção (A e B) com *Phdp* foi necessário efetuar previamente um ensaio de determinação da dose letal (LD₅₀) para os juvenis *Solea senegalensis* com a estirpe patogénica PC566.1. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na figura 9. A percentagem de mortalidade cumulativa foi diferente para as três concentrações utilizadas. A concentração de 10⁵ CFU mL⁻¹ foi a primeira a registar mortalidade, logo ao quinto dia e foi também a que registou a mortalidade mais elevada (95%). As concentrações de 10³ e 10⁴ CFU mL⁻¹ registaram a primeira morte no dia seis e atingiram percentagens de mortalidade cumulativa superiores a 70 e 80%, respetivamente. É possível verificar que a mortalidade máxima se dá entre os dias 5 e 7 do ensaio. A partir do dia 8 não se verificou mortalidade. No grupo CTRL não ocorreu mortalidade ao longo de todo o ensaio. A dose letal (LD₅₀) do agente patogénico foi determinada como sendo 0,1 mL de 1,9 × 10³ CFU mL⁻¹ por peixe para *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (anexo I).

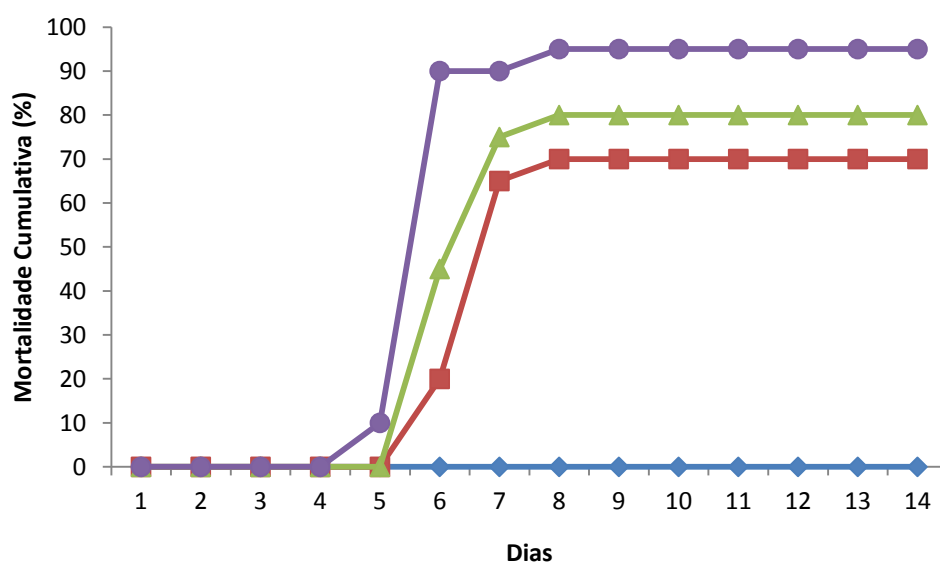


Figura 9: Mortalidade cumulativa (%) de *Solea senegalensis* quando infetados com diferentes concentrações de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* 10³ CFU mL⁻¹ (■) 10⁴ CFU mL⁻¹ (▲) e 10⁵ CFU mL⁻¹ (●) e o grupo CTRL (◆) injetados com HBSS 1× (n = 10 por tratamento).

4.2.2 Ensaios de infecção (A e B) com *Phdp*

No ensaio de infecção A os animais foram transportados para as novas instalações e infetados no mesmo dia. Três dias após a infecção (amostragem) observou-se que os animais apresentavam sintomas de pasteurelose como úlceras, fígados anêmicos, órgãos liquefeitos, barbatanas hemorrágicas e nódulos brancos em alguns órgãos. Mas até ao término deste ensaio (14 dias) não se verificou mortalidade.

No ensaio de infecção B os juvenis foram aclimatizados durante 8 dias nas novas instalações e só após a aclimatização foram infetados. Durante a amostragem deste ensaio os juvenis apresentavam sintomas semelhantes aos descritos anteriormente. As mortalidades verificadas no decorrer deste ensaio apresentam-se na tabela XII.

Tabela XII: Percentagem de mortalidade e percentagem relativa de sobrevivência (RPS) no ensaio de infecção B (com aclimatização).

Dieta	Mortos/Total peixes	Mortalidade (%)	RPS
CTRL	2/20	10	--
PB ₁	1/20	5	50
PB ₂	1/19	5,3	47,4
PB ₃	0/17	0	100
PB ₄	0/20	0	100
PB ₅	1/20	5	50

A primeira mortalidade nos grupos infetados com *Phdp* foi observada ao oitavo dia pós-infecção (dieta PB₂). A percentagem cumulativa de mortalidade observada na dieta CTRL foi de 10%, nas restantes dietas testadas a percentagem de mortalidade variou entre os 0 e 5%. Sendo que as dietas PB₃ e PB₄ foram as que não registaram qualquer mortalidade após a infecção. Todas as mortalidades observadas foram causadas por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Austin & Austin (2007), isolado a partir de culturas de fígado e rim (resultados não apresentados).

Em todos os parâmetros imunológicos avaliados, verificou-se que existiram diferenças significativas entre os animais infetados e animais placebo (figura 10). A atividade da peroxidase teve uma resposta idêntica nas duas infeções (figura 10 E e F), sendo os valores dos animais placebo (ensaio A: $59,91 \pm 30,47$ Uni. mL⁻¹; ensaio B: $37,32 \pm 23,58$ Uni. mL⁻¹) significativamente superiores em relação aos infetados (ensaio A: $31,49 \pm 25,34$ Uni. mL⁻¹; ensaio B: $11,63 \pm 12,57$ Uni. mL⁻¹).

Pelo contrário tanto a atividade da lisozima (figura 10 C e D) como o ACH50 (figura 10 A e B) tiveram respostas contrárias nas duas infeções. Na infecção A os animais placebo mostraram valores de ACH50 ($26,97 \pm 19,27$ EU mL⁻¹)

significativamente superiores em relação aos infetados ($15,82 \pm 9,31 \text{ EU mL}^{-1}$), enquanto no ensaio B ocorreu o oposto (placebo: $38,59 \pm 29,23 \text{ EU mL}^{-1}$; infetados: $69,82 \pm 39,48 \text{ EU mL}^{-1}$). Antagônicamente, na atividade da lisozima da infecção A, foram os animais infetados ($1463,55 \pm 760,67 \text{ EU mL}^{-1}$) que mostraram valores significativamente superiores em relação aos placebo ($1072,31 \pm 568,08 \text{ EU mL}^{-1}$), enquanto que no ensaio B ocorreu o oposto (placebo: $1687,2 \pm 824,68 \text{ EU mL}^{-1}$; infetados: $1096,3 \pm 534,73 \text{ EU mL}^{-1}$).

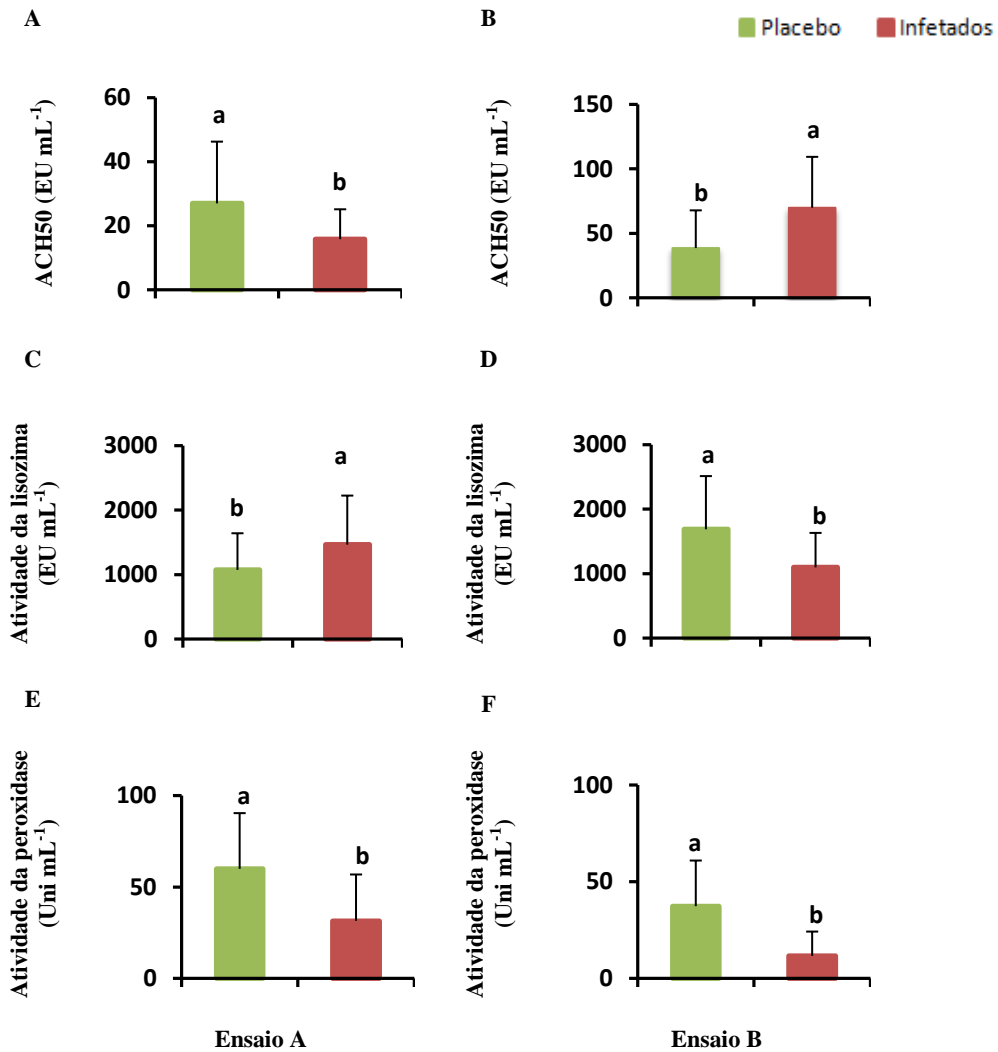


Figura 10: Parâmetros imune-inatos em juvenis de linguado placebo (não infetados) e infetados com *Phdp* (infecções A e B). Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão ($n = 36$ por tratamento). Letras diferentes em expoente significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre animais placebo e infetados.

O índice de estimulação para a atividade do complemento (figura 11) apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) entre ensaios para as diferentes dietas, exceto na dieta PB₁ (ensaio A: $0,85 \pm 0,46$; ensaio B: $0,84 \pm 0,62$). No entanto, não se observaram

diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos considerando a análise a 2 fatores, nem houve diferenças significativas em relação à dieta CTRL.

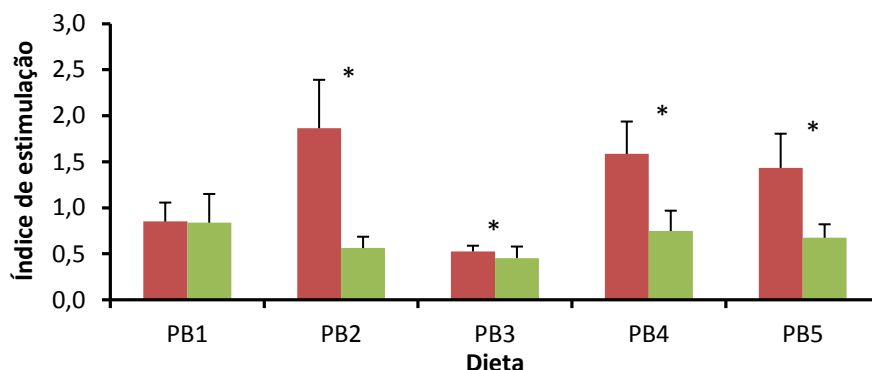


Figura 11: Atividade do complemento (ACH50) de juvenis de *Solea senegalensis* infetados com *Phdp*, infecção A (■) e infecção B (■). Resultados estão expressos em índice de estimulação (média \pm desvio padrão; $n=6$). Asterisco (*) indica diferenças significativas (t-test; $p<0,05$) entre ensaios para a mesma dieta. A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre dieta*infecção (ANOVA a 2 fatores; $p>0,05$).

Na figura 12 pode observar-se que a estimulação da lisozima foi significativamente superior na infecção A para todas as dietas. No entanto, não se observaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos considerando a análise a 2 fatores, nem houve diferenças significativas em relação à dieta CTRL.

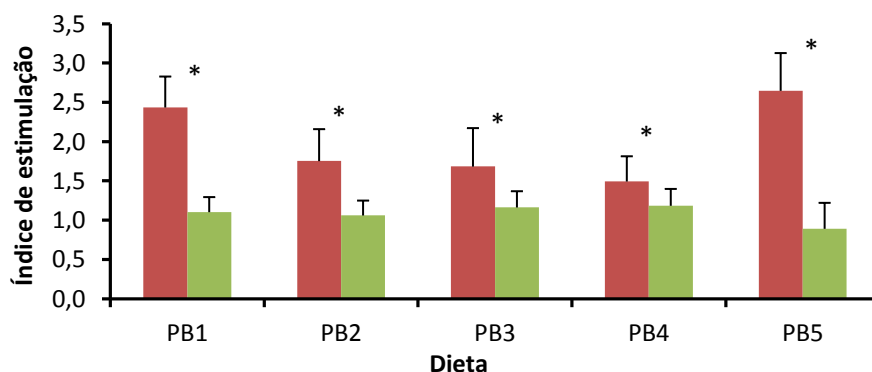


Figura 12: Atividade da lisozima de juvenis de *Solea senegalensis* infetados com *Phdp*, infecção A (■) e infecção B (■). Resultados estão expressos em índice de estimulação (média \pm desvio padrão; $n=6$). Asterisco (*) indica diferenças significativas (t-test; $p<0,05$) entre ensaios para a mesma dieta. A ausência de letras em expoente indica a ausência de diferenças significativas entre dieta*infecção (ANOVA a 2 fatores; $p>0,05$).

Relativamente à atividade da peroxidase, no ensaio A observaram-se diferenças significativas entre a dieta CTRL ($51,21 \pm 29,95$) e as dietas PB₁ ($9,44 \pm 11,67$) e PB₃ ($10,67 \pm 11,81$). No ensaio B, observaram-se diferenças significativas entre a dieta CTRL ($28,65 \pm 20,06$) e as dietas PB₁ ($5,89 \pm 4,12$) e PB₂ ($7,39 \pm 6,61$).

O índice de estimulação foi significativamente superior na infecção A para todas as dietas. Verificaram-se também diferenças significativas entre as dietas, dentro de cada ensaio, sendo a estimulação da dieta PB₁ ($0,31 \pm 0,39$) estatisticamente inferior às dietas PB₄ ($1,31 \pm 0,59$) e PB₅ ($1,12 \pm 0,66$). Também a dieta PB₃ ($0,36 \pm 0,39$) apresentou diferenças significativas em relação à dieta PB₄ ($1,31 \pm 0,59$).

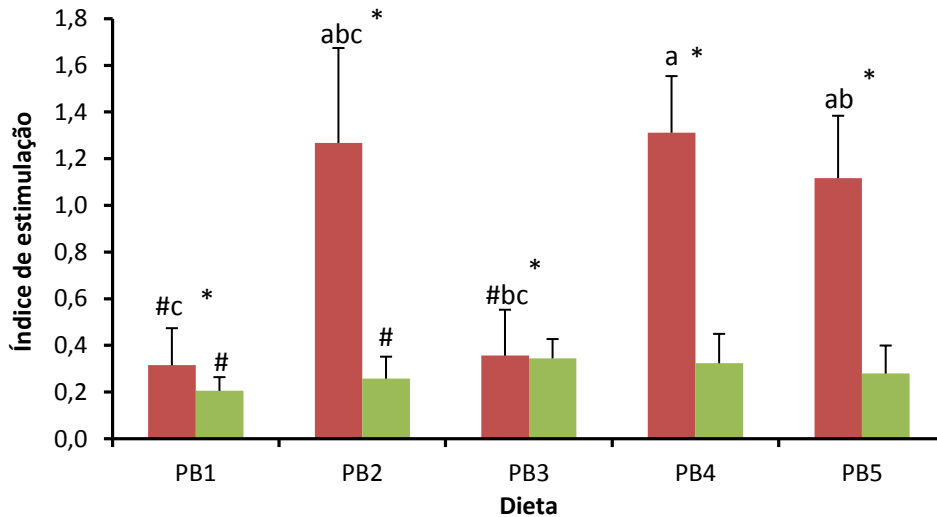


Figura 13: Atividade da peroxidase de juvenis de *Solea senegalensis* infetados com *Phdp*, infecção A (■) e infecção B (■). Resultados estão expressos em índice de estimulação (média ± desvio padrão; n=6). Cardinal (#) indica diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo CTRL. Asterisco (*) indica diferenças significativas (t-test; $p < 0,05$) entre ensaios para a mesma dieta. Letras diferentes (a, b, c) significam diferenças significativas (Mann-Whitney; $p < 0,05$) entre dietas para o mesmo ensaio.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

Vários estudos avaliaram o crescimento do linguado senegalês (*Solea senegalensis*) quando suplementado com probióticos (Chabrigón *et al.*, 2005; Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010; García de la Banda *et al.*, 2012; Tapia-Paniagua *et al.*, 2012), sendo que em quase todos estes estudos os probióticos utilizados são do género *Shewanella* isolado da pele de dourada (*Sparus aurata*).

A maioria dos estudos publicados utiliza culturas de bactérias únicas, mas é grande a especulação se duas ou até mesmo várias combinações de probióticos possam ser mais benéficas (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

Neste trabalho avaliou-se a performance de crescimento, parâmetros morfométricos, resposta imuno-inata (celular e humoral) e proteção contra *Phdp* de linguado senegalês quando suplementados com probióticos isolados do intestino da própria espécie (*Solea senegalensis*). As bactérias avaliadas, pertencem aos dois grandes grupos, gram-negativas: *Pseudomonas* e *Shewanella* e gram-positivas: *Enterococcus* e *Arthrobacter*. Segundo a revisão de Newaj-Fyzul *et al.* (2014) todos os géneros de bactérias que utilizamos já foram avaliadas e estudadas como possíveis probióticos para a aquacultura. No entanto a bactéria *Shewanella* é a única referida neste artigo como já tendo sido testada em linguado, promovendo o seu crescimento e proteção contra *Phdp*.

A quantidade eficaz e normalmente recomendada de incorporação de probiótico em dietas experimentais são de doses que rondam 1×10^8 - 1×10^{10} CFU de bactérias por kg de ração (Charalampopoulos & Rastall, 2009). Sendo que as doses recomendadas pela regulamentação da EU para o único probiótico autorizado (*Pediococcus acidilactici*) são de 10^9 CFU Kg⁻¹. No nosso trabalho a dose utilizada de cada probiótico foi sempre superior a 10^9 CFU Kg⁻¹ da ração.

Os resultados obtidos no ensaio de crescimento mostram que as dietas PB₂ (*Enterococcus* sp.) e PB₄ (*Arthrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp.) tiveram um crescimento significativamente mais baixo ($p < 0,05$) quando comparado com a dieta CTRL. Sugerindo que a adição do probiótico *Enterococcus* sp. e a mistura dos probióticos *Arthrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. não beneficiaram o crescimento dos juvenis de linguado. No entanto todas as dietas com a presença de *Shewanella* sp. (PB₁, PB₃ e PB₅) mostraram um desempenho idêntico á dieta CTRL.

A maioria dos estudos sobre o efeito de probióticos incorporados na ração é realizado com bactérias vivas (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Merrifield *et al.*, 2010; García de la Banda *et al.*, 2012). Panigrahi *et al.* (2005) relataram que em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a utilização de células vivas como probiótico induz melhores resultados do que quando as células são inativadas (pelo calor ou liofilizadas). No entanto, existem muitos estudos utilizando células inativadas, mortas ou liofilizadas (Irianto & Austin, 2003; Panigrahi *et al.*, 2005; Panigrahi *et al.*, 2007; Taoka *et al.*, 2006; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007; García de la Banda *et al.*, 2010; García de la Banda *et al.*, 2012; Sáez, 2011). Estes estudos são importantes porque para a indústria da aquacultura a administração de células inativadas ou liofilizadas torna-se mais viável do que o uso de células vivas (Tapia-Paniagua *et al.*, 2012). Estas trazem maior estabilidade às rações, diminuindo os custos de produção e eliminando vários problemas relacionados com o armazenamento, viabilidade e durabilidade. Para conferir benefícios para o hospedeiro é desejável que os probióticos estejam viáveis e em concentrações elevadas ao chegarem ao intestino (Panigrahi *et al.*, 2005). Nos estudos de Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009); García de la Banda *et al.* (2010) e García de la Banda *et al.* (2012) as bactérias probióticas foram encapsuladas em alginato de cálcio, protegendo-as contra condições adversas, como o armazenamento e sistema digestivo do peixe (condições ácidas do estômago, enzimas digestivas e sais biliares). No entanto, apenas Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009), observou que as dietas liofilizadas, encapsuladas em alginato e administradas a temperaturas de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ promoveram o crescimento de juvenis de linguado senegalês. No trabalho de Rosas-Ledesma *et al.* (2012) observaram que Pdp11 sobreviveu no trato intestinal de linguados quando administrado em cápsulas de alginato, mas quando o probiótico foi adicionado diretamente nos *pellets*, a bactéria não foi recuperada no trato intestinal. Estes resultados foram atribuídos ao facto de os *pellets* para peixe constituírem ambientes adversos para a maioria das bactérias levando a que a sua sobrevivência seja reduzida e de muito curta duração. Também confirmaram que a baixas temperaturas (4°C) o metabolismo bacteriano foi retardado e a acumulação de produtos tóxicos derivados dos metabolismos foi provavelmente minimizado.

No nosso trabalho a bactéria *S. hafniensis* foi incorporada na ração após ter sido inativa pelo calor (1h a 60°C), as restantes bactérias foram adicionadas diretamente na dieta sem qualquer revestimento de alginato. No entanto não se verificaram melhorias

no crescimento dos juvenis nas diferentes dietas. Sáez (2011) realizou um estudo com incorporação directa de bactérias (*S. putrefaciens* - Pdp11) em diferentes concentrações, em dieta de juvenis de linguado, liofilizadas ou inativas pelo calor, como aditivo e sem revestimento de alginato. Após 52 dias de suplementação, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos, presumindo-se que apesar de a quantidade de probiótico incorporada ter sido elevada, as bactérias inativadas não exerceram o mesmo efeito benéfico quando incorporadas numa forma ativa. Também García de la Banda *et al.* (2010) não obtiveram melhorias significativas no crescimento, parâmetros zootécnicos e índices morfométricos em peixes alimentados durante 69 dias com o mesmo probiótico (Pdp11) liofilizado e encapsulado em alginato de cálcio, justificando estes resultados com a temperatura que utilizaram no ensaio ($16,6 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009) utilizaram o mesmo probiótico (Pdp11) mas a 21°C e já encontraram diferenças significativas entre as dietas com probiótico e a dieta controlo. Na nossa experiência, o ensaio de crescimento foi efetuado à temperatura de 19°C não se tendo observado diferenças no crescimento dos juvenis.

Na análise da composição proximal das dietas (tabela IX) pode-se verificar que estas apresentam-se isoenergéticas ($21,8 \text{ kJ g}^{-1}$ de ração), isoproteicas (55%) e isolipídicas (17%). Podendo assim, confirmar-se que à semelhança de outros trabalhos como por exemplo Sáez (2011), que a adição de probióticos nas dietas não alterou a composição química das mesmas. No entanto, as dietas apesar de isolipídicas, tinham um teor ligeiramente elevado de lípidos (cerca 17%). García de la Banda *et al.* (2012) e Borges *et al.* (2013) concluíram que elevados níveis de lípidos não promovem o crescimento desta espécie. Uma inadequada relação entre as concentrações de lípidos e proteína fornecidas na dieta, pode conduzir à diminuição na taxa de crescimento, piorando a conversão alimentar, além de levar á retenção de gordura corporal, reduzindo o rendimento de carcaça no processamento. Também Rueda-Jasso *et al.* (2004) verificaram uma tendência para taxas de crescimento mais rápidas e melhor conversão alimentar em peixes alimentados com dietas contendo níveis lipídicos mais baixos (11%) em comparação com altos níveis de lipídios (21%).

Relativamente à composição química das carcaças os resultados foram semelhantes aos observados por Borges *et al.* (2013) e Sáez (2011), para uma dieta com uma percentagem de lípidos (17%) e proteína (54%).

O mecanismo inato dos peixes fornece a primeira linha de defesa imunológica. Apesar de já existirem vários trabalhos que avaliam o sistema imune inato após uma suplementação com probióticos (Panigrahi *et al.*, 2005; Harikrishnan *et al.*, 2011; Díaz-Rosales *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Sharifuzzaman & Austin, 2009; Geng *et al.*, 2012), no entanto ainda existem poucos trabalhos a fazer esse estudo em *Solea senegalensis* (Batista *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2013; Díaz-Rosales *et al.*, 2009). As atividades do complemento (ACH50), da lisozima e da peroxidase são parâmetros vulgarmente utilizados para avaliar o estado imunológico não específico nos peixes assim como os parâmetros imuno-celulares (ROS e NO). Após 85 dias de suplementação com probióticos fomos avaliar os parâmetros imuno-inatos dos juvenis de linguado.

Não se observaram diferenças significativas nos parâmetros imuno celulares (ROS e NO). Estes resultados podem dever-se unicamente por não ter sido possível obter o número recomendado de leucócitos (10^7 células mL⁻¹) para a realização destes ensaios. Não observamos a formação de uma mono-camada de células nos poços, daí ter havido necessidade de determinar o número total médio de células por peixe. Acabamos por concluir que o número de células utilizado foi menos de metade do recomendado, tendo uma média de 10^3 células mL⁻¹. No artigo de Costas *et al.* (2011), também referiram a utilização de um número de leucócitos inferior ao recomendado (10^5 células mL⁻¹) e detetaram diferenças significativas entre os tratamentos estudados. Por outro lado, também se poderá ponderar a ideia da suplementação com probióticos poder não alterar os níveis basais dos parâmetros imuno-celulares. No trabalho de Batista *et al.* (2014) avaliaram a resposta imunológica de linguados (*Solea senegalensis*) alimentados com dietas suplementadas com probióticos comerciais (mono-espécies e multi-espécies) e observaram valores muito semelhantes ao do nosso trabalho. A avaliação da explosão respiratória, após um tratamento probiótico em peixes é contraditória. Alguns estudos indicam que os probióticos não têm impacto significativo sobre esse mecanismo de defesa não específica do peixe (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Sharifuzzaman & Austin, 2009; Díaz-Rosales *et al.*, 2006). No entanto, outros estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram aumento significativo na atividade oxidativa por vários probióticos em diferentes animais aquáticos (Salinas *et al.*, 2006; Harikrishnan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008a).

No nosso estudo a dieta com probiótico PB₁ foi a única que obteve resultados semelhantes à dieta CTRL, 0,33 e 0,32 nmoles O²⁻ respetivamente, enquanto que as restantes dietas obtiveram resultados superiores. Este resultado talvez esteja relacionado com o facto de que a bactéria *Shewanella* sp. presente em PB₁ apresentar-se na forma inativa em contraste com os outros probióticos que são compostos por bactérias na forma activa. Panigrahi *et al.* (2005) observaram que a utilização de células vivas como probiótico induz uma resposta imunológica mais elevada na truta arco-íris, quando comparado com células inativas.

Relativamente às atividades do complemento (ACH50), da lisozima e da peroxidase não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos. Vários autores concluíram que inúmeros probióticos não afetaram estes parâmetros imunes: atividade da peroxidase (Salinas *et al.*, 2006; Choi & Yoon, 2008; Brunt *et al.*, 2007; Díaz-Rosales *et al.*, 2006); atividade da lisozima (Balcázar *et al.*, 2007; Pieters *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010) e ACH50 (Batista *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2014).

As altas densidades de cultivo, o transporte e o manuseamento necessário para procedimentos de triagem e vacinação são práticas comuns na aquacultura marinha, sendo fatores que induzem *stress* nos animais. Segundo Uribe (2011), vários fatores internos e externos podem influenciar os parâmetros da resposta imune inata. No presente trabalho tivemos como objectivo avaliar a resposta imunológica dos juvenis após uma infeção com *Phdp*, estando ou não aclimatizados a um novo ambiente (*stress* abiótico).

De acordo com os valores obtidos no ensaio de determinação da dose letal (LD₅₀), conclui-se que o LD₅₀ da estirpe PC566.1 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* para linguados juvenis de cerca de 16g era de $1,9 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ por peixe. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Costas *et al.* (2013) que para a mesma estirpe obteve um LD₅₀ de 5×10^3 CFU mL⁻¹ para linguados juvenis com um peso um pouco superior ($37,9 \pm 12,9$ g). A sintomatologia comportamental e física, observada neste trabalho após a infeção, foi semelhante à descrita por outros autores (Zorrilla *et al.*, 1999; Austin & Austin, 2007). Os animais infetados apresentaram principalmente uma coloração mais escura e não mostraram apetite. Durante a amostragem também se pode observar que os fígados estavam anémicos e desfaziavam-se facilmente, sendo que alguns animais também apresentaram úlceras e barbatanas

hemorrágicas. Para a confirmação da infecção por *Phdp*, isolaram-se bactérias obtidas dos órgãos dos animais que morreram durante os ensaios e confirmou-se a presença do *Phdp*.

No ensaio de infecção A, não se registou qualquer mortalidade e mesmo no ensaio de infecção B a mortalidade foi quase nula. Constatamos posteriormente que a suspensão de *Phdp* utilizada na infecção não estava em estado puro, mas sim contaminada. Efetuou-se então, um novo plaqueamento da suspensão (supostamente pura) de *Phdp*, para determinar a percentagem de cada uma das bactérias (resultados não apresentados). Isolaram-se duas bactérias diferentes, o *Phdp* e uma segunda bactéria identificada como *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (T). Conclui-se que a suspensão utilizada para infetar os animais teria $2,4 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ (anexo II) sendo que $\frac{3}{4}$ das bactérias eram efetivamente *Phdp*. Concluimos que os animais foram então infetados com uma concentração de $1,8 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ de *Phdp* e não o valor anteriormente referido ($1,9 \times 10^3$ CFU mL⁻¹). É pouco provável que a bactéria *Staphylococcus epidermidis* tenha causado qualquer processo infeccioso aos animais, mas como estava presente pode ter diminuído a virulência desempenhada pelo patógeno *Phdp*. Além disso, também o *Phdp* poderá ter perdido alguma virulência devido à sua intensa manipulação de congelamento e descongelamento. O conjunto destas situações e o facto da temperatura utilizada nestes ensaios ser menor que a descrita como propensa a maior virulência do *Phdp* (superior a 21°C), poderão de certa forma justificar os resultados obtidos. Por outro lado, em ambos os ensaios, os animais mostraram estar a responder à infecção, uma vez que se verificaram diferenças significativas em todos os parâmetros imunológicos avaliados, quando comparando os peixes infetados com os placebos (figura 10).

A atividade da lisozima e o ACH50 tiveram respostas contrárias nas duas infecções. Quando os animais foram submetidos a *stress* abiótico previamente à infecção, os animais placebo mostraram valores superiores em relação aos infetados no ACH50, enquanto no ensaio B ocorreu o oposto. Antagónicamente, na atividade da lisozima esses animais do ensaio A do grupo placebo mostraram valores superiores em relação aos infetados, ocorrendo o oposto no ensaio B. As condições de *stress* podem induzir variações na atividade da lisozima, apesar da influência do *stress* se manter controversa. Este parâmetro tem obtido respostas diferentes quando avaliado sob condições de *stress*, apresentando valores que diminuem com o *stress* (Yin *et al.*, 1995; Jeney *et al.*, 1997)

assim como podem aumentar (Fevolden *et al.*, 1994; Rotllant *et al.*, 1997). Caruso *et al.* (2002) sugere que o tempo de recuperação dos níveis de lisozima após uma situação de *stress* pode ser longo.

Existem alguns trabalhos que avaliaram a influência da administração de probióticos na alimentação de juvenis de linguados, na proteção contra o patógeno *Phdp*. Díaz-Rosales *et al.* (2009) verificaram que o probiótico Pdp13 (*Shewanella* sp.) não aumentou significativamente a produção do anião peróxido (ROS), mas mesmo assim os juvenis alimentados com dietas suplementadas com Pdp 13 mostraram maior sobrevivência depois de infetados com *Phdp*. No trabalho de Banda *et al.* (2010) verificaram que as estirpes Pdp11 e Pdp13 (*Shewanella* sp.) conferem proteção contra este patógeno, apesar de apenas a estirpe Pdp13 mostrar também diferenças significativas no crescimento e composição corporal dos juvenis, quando comparada com a dieta controle. Em 2012, Banda *et al.* confirmaram que tanto células frescas como liofilizadas de Pdp11 e Pdp13 conferiram proteção contra o patógeno, no entanto apenas as células Pdp 11 frescas incrementaram a performance dos juvenis. Denota-se que o género *Shewanella* pode ser um potencial probiótico com grande importância e influência na taxa de sobrevivência de *S. senegalensis* quando infetados com *Phdp*.

Na avaliação da resposta do ACH50 (figura 11) na atividade da lisozima (figura 12), não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto os índices de estimulação foram superiores, para os animais que sofreram *stress* biótico em conjunto com *stress* abiótico. Esta situação, poderá estar relacionada com o facto de os animais ao serem transportados estarem já a responder a esse fator de *stress*, tendo assim iniciado a resposta imunológica, mesmo antes da infeção e estarem então mais preparados para se defenderem do agente bacteriano patógeno. Além disso, destacam-se os valores mais elevados de estimulação observados na atividade da lisozima ($1,48 \pm 0,79 - 2,65 \pm 1,18$), comparando com os restantes parâmetros avaliados. Costas *et al.* (2013), verificaram que a resposta da lisozima não tem diferenças significativas quando são administradas doses de 2×10^2 ou de 2×10^6 CFU mL⁻¹ da mesma estirpe de patogénico, evidenciando a ideia de que este parâmetro é ativado apenas com a presença do patógeno, não sendo dependente da dose administrada. De acordo com Yildiz (2006) a atividade da lisozima poderá ser dependente do grau e a intensidade de *stress*, da sua duração assim como do tipo de agente provocador de *stress*. Em contraste, na atividade

da peroxidase observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos no ensaio A. As dietas PB₄ e PB₅ mostraram índice de estimulação superior em relação ao PB₁, apesar de não terem tido diferenças com a dieta CTRL. Contrariamente aos outros parâmetros analisados, a estimulação da peroxidase mostrou em ambos os ensaios, dietas significativamente diferentes da dieta CTRL. Possivelmente, a avaliação dos parâmetros imunológicos inatos pode ter sido muito tardia, visto que neste ensaio avaliamos esta resposta 72 horas após a infecção. Sendo que Costas *et al.* (2013) avaliaram os mesmos parâmetros e confirmou a existência de diferenças significativas nos diferentes parâmetros para a mesma estirpe de patogénico, mas essa análise foi realizada às 6 e 24h após a infecção.

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES

A aplicação de probióticos na aquacultura tem sido exaustivamente estudada nos últimos anos, mostrando-se sustentável e uma estratégia promissora não só no contexto do controlo de doenças mas também no crescimento, imunologia e nutrição animal.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os probióticos utilizados não conferiram um melhor crescimento em comparação com a dieta CTRL. Sendo que não se observaram diferenças na composição proximal das carcaças nem nos parâmetros imunes analisados.

Em relação à utilização de probióticos mono ou multi-espécies e seus efeitos no crescimento, mecanismos imunológicos, bem como na resistência ao patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, concluímos que não houve diferenças significativas entre o uso de mono ou multi-espécies, apesar de os probióticos multi-espécies PB₄ e PB₅ terem estimulado positivamente a atividade da peroxidase comparando com o mono-espécie PB1.

Após a infeção com *Phdp*, a avaliação da resposta humoral imuno-inata e a sua interação com o *stress* abiótico causado pelo *stress* do transporte dos animais, revelou diferenças óbvias entre os animais infetados e não infetados. Isto demonstra que a infeção associada ou não a um fator de *stress* abiótico leva a uma resposta imunológica diferente destes animais em relação aos animais não infetados (placebo).

No entanto, este trabalho pelas razões acima referidas, demonstrou que são necessárias mais informações sobre o mecanismo de ação dos probióticos. Claramente, os probióticos podem permitir múltiplas respostas por parte do anfitrião e além disso, diferentes probióticos poderiam conduzir a efeitos diferentes.

Como não se observaram diferenças significativas no crescimento pode dizer-se que o uso de probióticos na aquacultura pode ser favorável apenas quando os animais são sujeitos a algum *stress*. Não sendo necessário a utilização de probióticos quando o sistema se apresenta nas condições ideais, pois o contacto com patógenos é mínimo.

Concluindo-se que os resultados deste trabalho não são provas suficientes de que os probióticos estudados têm um papel importante a desempenhar na aquacultura de linguado senegalês.

PERSPETIVAS FUTURAS

A decisão do uso de probióticos na aquicultura tem sido em grande parte, resultado do uso empírico e não com base em critérios científicos. Hoje em dia, há um maior conhecimento dos mecanismos de ação dos probióticos, mas são necessárias mais informações sobre a interação probiótico-infeção para se compreender melhor o efeito real dos probióticos.

Muitas das falhas nas pesquisas de novos probióticos podem ser atribuídas à seleção de estirpes probióticas inadequadas, por isso é importante definir critérios de seleção adequados para novos potenciais probióticos.

Vários aspetos podem ser considerados para futuras pesquisas, o mecanismo de ação dos probióticos, os processos digestivos e de absorção no intestino dos peixes, o uso combinado de probióticos, a utilização de células vivas ou inativas, a encapsulação das células probióticas, assim como as interações *in vivo* com microrganismos patogênicos.

Quanto aos parâmetros a avaliar num ensaio parece-me importante referir que se deveria avaliar o crescimento desta espécie com uma ração com menor teor lipídico. Quanto aos ensaios de infeção com patógeno seria importante avaliar a resposta imunológica um pouco mais cedo ou mesmo em tempos diferentes de modo a perceber se o tempo é um fator importante nos parâmetros avaliados. Seria também de extrema importância estudar a hipótese de os macrófagos migrarem para local onde foi feita a infeção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ISO 6498:2012 Animal feeding stuffs - Guidelines for sample preparation, pp. 46. International Organization for Standardization.
- ISO 6887-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 09/05/2011.
- ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
- Regulamento (CE) Nº 429/2008 da Comissão de 25 de Abril de 2008 relativo às regras de execução do Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere à preparação e apresentação de pedidos e à avaliação e autorização de aditivos destinados à alimentação animal, pp. 65. Jornal Oficial da União Europeia 22.5.2008 L 133/1-L 133/65.
- Regulamento (CE) Nº 911/2009 da Comissão de 29 de Setembro de 2009 relativo à autorização de uma nova utilização da preparação de *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M como aditivo em alimentos para salmonídeos e camarões (detentor da autorização: Lallemand SAS). Jornal Oficial da União Europeia 30/09/2009 L257/210-L257/211.
- Regulamento (CE) Nº 1831/2003 do parlamento europeu e do conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal, Vol. 1831/2003, pp. 29-43. Jornal Oficial da União Europeia, 18.10.2003, L 268/29-L 268/43.
- Aguirre-Guzmán, G., Lara-Flores, M., Sánchez-Martínez, J.G., Campa-Córdova, A.I. & Luna-González, A. (2012). The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *African Journal of Microbiology Research*, **6**, 4845-4857.
- Ahmadvand, S., Jafaryan, H., Farahi, A. & S., A. (2011). Effect of frozen *Daphnia magna* diet mixed with probiotic protexin on growth and survival of Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fy reared under controlled conditions. *Online Journal of Animal and Feed Research*, **2**, 34-39.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **126**, 171-198.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.A. & Martínez, M.A. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **45**, 91-95.

- AOAC (2006). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H. & Hirono, I. (2008). Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. In: Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T.D., Kaiser, M.J. (Eds). *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress, 263-276.
- Arijo, S., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., Rico, R.M., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Toranzo, A.E. & Moriñigo, M. (2005). Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **25(4)**, 148.
- Austin, B. & Austin, D.A. (2007). *Bacteria fish pathogens: disease of farmed and wild fish* Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Azevedo, R.V. & Braga, L.G.T. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. In *Probiotic in Animals* (Rigobelo, E. ed.), pp. 16. InTech.
- Balcázar, J.L., Blas, I.d., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, **114**, 173-186.
- Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O. & Muzquiz, J.L. (2007). Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **51**, 185-193.
- Batista, S., Ramos, M.A., Cunha, S., Barros, R., Cristóvão, B., Rema, P., Pires, M.A., Valente, L.M.P. & Ozório, R.O.A. (2014). Immune responses and gut morphology of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) fed mono-species and multi-species probiotics. *In press*.
- Batista, S., Tapia-Paniagua, S.T., Moriñigo, M.A., Nuñez-Díaz, J.A., Gonçalves, J.F.M., Barros, R., Cristóvão, B., Valente, L.M.P. & Ozório, R.O.A. (2013). Expression of immune response genes in sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) induced by dietary probiotic supplementation following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, **34**.
- Borges, P., Medale, F., Veron, V., Pires, M.d.A., Dias, J. & Valente, L.M.P. (2013). Lipid digestion, absorption and uptake in *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **166**, 26-35.
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L. & Valente, L.M.P. (2009). Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *British Journal of Nutrition*, **102**, 1007-1014.

- Bruhn, J.B. (2006) Ecology, antibacterial activity and biofilm formation of marine *Roseobacter* strains. In *Department of Fisheries Research*, Vol. Tesis PhD. Danish Institute for Fisheries Research.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. & Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, **30**, 573–579.
- Burr, G. & Gatlin, D. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, **36**, 425-436.
- Cabral, E.M., Bacelar, M., Batista, S., Castro-Cunha, M., Ozório, R.O.A. & Valente, L.M.P. (2011). Replacement of fishmeal by increasing levels of plant protein blends in diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* **322-323**, 74–81.
- Cabral, E.M., Fernandes, T.J.R., Campos, S.D., Castro-Cunha, M., Oliveira, M.B.P.P., Cunha, L.M. & Valente, L.M.P. (2013). Replacement of fish meal by plant protein sources up to 75% induces good growth performance without affecting flesh quality in on-growing Senegalese sole. *Aquaculture*, **380-383**, 130-138.
- CAN (1993). *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, USA.
- Caruso, D., Schlumberger, O., Dahm, C. & Proteau, J.P. (2002). Plasma lysozyme levels in sheatfish *Silurus glanis* (L.) subjected to stress and experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research*, **33**, 999-1008.
- Caruso, G., Caruso, R., Denaro, M.G. & Genovese, L. (2011). Non-specific immune parameters in some new candidate species for mediterranean aquaculture: results of first studies. *The Open Marine Biology Journal*, **5**, 3-11.
- Chabrillón, M., Rico, R.M., Arijó, S., Díaz-Rosales, P., C., B.M. & Moriñigo, M.A. (2005). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, **28**, 531-537.
- Charalampopoulos, D. & Rastall, R.A. (2009). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, Springer Science.
- Choi, S.-H. & Yoon, T.-J. (2008). Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary heat-inactivated potential probiotics. *Immune Network* **8**, 67-74.
- Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, **1**, 1397-1406.

- Corcionivosch, N., Drinceanu, D., Stef, L., Luca, I., Julean, C. & Mingyart, O. (2010). Probiotics – Identification and ways of action. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, **6**, 1-11.
- Costas, B., Conceição, L.E.C., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A. & Afonso, A. (2011). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology*, **31**, 838-847.
- Costas, B., Rêgo, P.C.N.P., Simões, I., Marques, J.F., Castro-Cunha, M. & Afonso, A. (2013). Cellular and humoral immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. *Journal of Fish Diseases*, **36**, 543–553.
- Cruz, P.M., Ibáñez, A. L., Hermosillo, O.A.M. & Saad, H. C. R. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *International Scholarly Research Network ISRN Microbiology*, **2012**, 13.
- Cunha, S., Batista, S., Barros, R., Cristóvão, B., Ozório, R., Valente, L., Carvalho, A.P., Rodrigues, C.M. & Gomes, A.M. (2012) Seleção e avaliação de estirpes de probióticos para uso na aquicultura de linguado (*Solea senagalensis*). Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- De Baets, L., Van Iwaarden, P., Meeus, N., Schimmel, H., Philipp, W. & H., E. (2009). First certified reference materials for molecular fingerprinting of two approved probiotic *Bacillus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 16-20.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. & Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnology*, **25**, 472-479.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. & Beev, G. (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research*, **1**, 1-29.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P. & Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*, **8**, 1153-1177.
- DGPA (2007). Plano Estratégico Nacional para a Pesca 2007 – 2013. Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura.
- DGRM (2013). Aquicultura, Vol. 2013. Direcção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos.

- Díaz-Rosales, P. (2006) Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. In *Facultad de ciencias - Departamento de Microbiología*, pp. 1-276. Universidad de Málaga.
- Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrilón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C. & Moriño, M.A. (2009). Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, **293**, 16-21.
- Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrilón, M., Balebona, M.C., Moriño, M.Á., Esteban, M.Á. & Meseguer, J. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 482-492.
- Dinis, M.T. (1986). Quatre soleidae de l'estuaire du Tage. Reproduction et croissance. Essai d'élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. In *Thèse d'État ès-Sciences Naturelles* Université de Bretagne Occidentale, France.
- Dinis, M.T. & Reis, J. (1995). Culture of *Solea* spp. In *Marine aquaculture finfish species diversification*, Vol. 16, pp. 9-19. Zaragoza : CIHEAM.
- Dinis, M.T., Reis, J., Arrobas, I., (1996). Evaluation of the farming potential for *Solea senegalensis* Kaup, a new species for aquaculture in the Mediterranean area. *Book of Abstracts World Aquaculture 96*, 107-109.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F. & Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, **176**, 27-38.
- Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assays. In: Stolen J. S., Fletcher T. C., Anderson D. P., Roberson B. S., van Muiswinkel W. B., (Eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven: SOS Publications, 101-103.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **9**, 291-308.
- Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, **25**, 827-839.
- Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L. & Dinis, M.T. (2007). Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research*, **38**, 696-707.
- FAO (2010). *The state of world fisheries and aquaculture*. , FAO, Roma.

- FAO (2012). *The state of world fisheries and aquaculture.*, FAO, Roma.
- Fevolden, S.E., Røed, K.H. & Gjerde, B. (1994). Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease resistance. *Fish & Shellfish Immunology*, **4**, 507-519.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Chabrilón, M., León-Rubio, J.M., Arijo, S., Pazos, G., María Lucas, L. & Moriño, M.Á. (2012). Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture Research*, **43**, 662-669.
- García de la Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J.M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M.C., Moriño, M.A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L.M., Linare, F., Arce, F. & Arijo, S. (2010). Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, **306**, 281–288.
- Gatesoupe, F.J. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **14** (1-3), 107-114.
- Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y. & Liu, X.Q. (2012). Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Nutrition*, **18**, 46-55.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. & Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, **126**, 131-138.
- Harikrishnan, R., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Balasundaram, C. & Heo, M.-S. (2011). Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **31**, 310-317.
- Holland, M.C.H. & Lambris, J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, **12**, 399-420.
- Howell, B., Cañavate, P., Prickett, R. & Conceição, L. (2006) The Cultivation of Soles. In *3rd Workshop Held at CIFPA el Toruño*, Cadiz, Spain.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. & White, P. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Fish Biology and Fisheries*, **13**, 379–407.
- INE (2012). *Estatísticas da Pesca 2011*, Instituto Nacional de Estatística, Portugal.

- Irianto, A. & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, **25**, 633–642.
- Irianto, A. & Austin, B. (2003). Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, **26**, 59-62.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. & Anderson, D.P. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, **154**, 1-15.
- Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, **173**, 111-133.
- Lara - Flores, M. (2011). The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Resercha Journal of Microbiology*, **2(12)**, 471-478.
- Lee, Y.K. & Salminen, S. (2009). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E. & Lamas, J. (2001). Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **195**, 17-21.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 137-151.
- Magnadottir, B. (2010). Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*, **12**, 361-379.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bøggwald, J. & Dalmo, R.A. (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **19**, 429-439.
- Makridis, P., Martins, S., Reis, J. & Dinis, M.T. (2008). Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Research*, **39**, 627-634.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bøggwald, J., Castex, M. & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, **302**, 1-18.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G. & Mohanta, K.N. (2012). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology Animinal Nutrition*, **97**, 405- 430.
- Moriarty, D.J.W., Decamp, O. & Lavens, P. (2005). Probiotics in aquaculture. In *AQUA Culture AsiaPacific Magazine*, Vol. September/Outober, pp. 14-16.

- Nayak, S.K. (2010a). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunology*, **29**, 2-14.
- Nayak, S.K. (2010b). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, **41**, 1553-1573.
- Neumann, N.F., Fagan, D. & Belosevic, M. (1995). Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, **19**, 473-482.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 1699-1706.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H. & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*. *In press*
- Nwachi, O.F. (2013). An overview of the importance of probiotics in aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, **8**, 30-32.
- Ochoa, L.S. (2012) Propuesta de nuevas cepas probióticas para uso en acuicultura. In *Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria*, Vol. Doctoral, pp. 240. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. & Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **243**, 241-254.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. & Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental & Comparative Immunology*, **31**, 372-382.
- Pick, E. (1986). Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Methods Enzymology*, **132**, 407-421.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B. & Lyndon, A.R. (2008). Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 723-732.
- Protexin, L. (2013) General FAQs. <http://www.protexinvet.com/pet-health/362/general-faqs> (consultado em 22/09/2013).

- Quade, M.J. & Roth, J.A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **58**, 239-248.
- Reed, L.J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, **27**, 493-497.
- Rico, R.M., Tapia-Paniagua, S., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C. & Morinigo, M.A. (2008). Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 752-760.
- Rigos, G. & Katharios, P. (2010). Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **20**, 47-70.
- Rodgers, C.J. & Furones, M.D. (2009). Antimicrobial agents in aquaculture: Practice, needs and issues. *Options Méditerranéennes*, **89**, 41-59.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R. & Toranzo, A.E. (1999). Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *Journal of Microbiological Methods*, **38**, 147-154.
- Rosas-Ledesma, P., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Moriñigo, M.A. & Balebona, M.C. (2012). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, **43**, 106-116.
- Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Abad, M.E. & Tort, L. (1997). Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, **156**, 279-290.
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L.E.C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T. & Sorgeloos, P. (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, **231**, 417-433.
- Sáenz de Rodrigáñez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrillon, M., Smidt, H., Arijó, S., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Cara, J.B. & Moyano, F.J. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality on juvenile Senegalese sole (*Solea Senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, **15**, 177-185.
- Sáez, D.M. (2011). Efectos de la administración del probiótico *Shewanella* pdp 11 en juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) y desarrollo de un método para su microencapsulación. In *Eacuela Superior de Ingeniería*, Proyecto fin de carrera. Universidad de Almería.

- Sahu, M.K., Swarnakumar, N.S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. & Kannan, L. (2008). Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal Microbiology*, **48**, 299-308.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, **172**, 63-92.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J. & Esteban, M.Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, **25**, 114-123.
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrilón, M., Moriñigo, M.Á. & Esteban, M.Á. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **111**, 279-286.
- Saurabh, S. & Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, **39**, 223-239.
- Schrezenmeir, J. & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **73**, 361S-364S.
- Secombes, C.J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen J. S., Fletcher T. C., Anderson D. P., Roberson B. S., van Muiswinkel W. B. (Eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven: SOS Publications., 137-154.
- Secombes, C.J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. (Eds). *Fish physiology series - The fish immune system: Organism, Pathogen, and Environment*. Vol. 15, Academic Press.
- Sharifuzzaman, S.M. & Austin, B. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, **27**, 440-445.
- Sihag, R.C. & Sharma, P. (2012). Probiotics: The new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *Journal of Fisceheries and Aquatic Science*, **7 (2)**, 72-103.
- Silva, J.M.G., Espe, M., Conceição, L.E.C., Dias, J., Costas, B. & Valente, L.M.P. (2010). Feed intake and growth performance of Senegalese sole (Kaup, 1858) fed diets with partial replacement of fish meal with plant proteins. *Aquaculture Research*, **41**, 20-30.
- Silva, J.M.G., Valente, L.M.P., Castro-Cunha, M., Bacelar, M. & Guedes de Pinho, P. (2012). Impact of dietary plant protein levels on the volatile composition of

- Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) muscle. *Food Chemistry*, **131**, 596-602.
- Sun, Y.-Z., Yang, H.-L., Ma, R.-L. & Lin, W.-Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 803-809.
- Sunyer, J.O., Gomez, E., Navarro, V., Quesada, J. & Tort, L. (1995). Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 2339-2346.
- Tafalla, C. & Novoa, B. (2000). Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, **24**, 623-631.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Kim, S.M., Park, S.I., Yoshikawa, T. & Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, **72**, 755-766.
- Tapia-Paniagua, S.T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., Banda, I.G., Lobo, C., Balebona, M.C. & Moriñigo, M.A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbiology and Ecology*, **60**, 310-319.
- Tapia-Paniagua, S.T., Díaz-Rosales, P., León-Rubio, J.M., García de La Banda, I., Lobo, C., Alarcón, F.J., Chabrilón, M., Rosas-Ledesma, P., Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Arijo, S., Esteban, M.A., Martínez-Manzanares, E., Mancera, J.M., Balebona, M.C. & Moriñigo, M.A. (2012). Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture International*, **20**, 1025-1039.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B. & Barja, J.L. (1991). Pasteurellosis in cultured seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, **246**, 37-61.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, **56 (10)**, 486-503.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 655-671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. & Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews*, **30**, 404-427.

- Wang, Y.-B., Tian, Z.-Q., Yao, J.-T. & Li, W.-F. (2008a). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, **277**, 203-207.
- Wang, Y., Li, J. & Lin J. (2008b). Probiotics in aquaculture - Challenges and outlook. *Aquaculture*, **281**, 4.
- Whitehead, P.J.P. (1984). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* Unesco, Paris.
- Whyte, S.K. (2007). The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, **23**, 1127-1151.
- Wright, A.v. (2005). Regulating the Safety of Probiotics – The European Approach. *Current Pharmaceutical Design*, **11**, 17-23.
- Wu, S.M., Shih, M.J. & Ho, Y.C. (2007). Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *The Journal of Biological Chemistry*, **145**, 218-226.
- Yildiz, H.Y. (2006). Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture. *Turkey Journal of Animal Science*, **30**, 265-269.
- Yin, Z., Lam, T.J. & Sin, Y.M. (1995). The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, **5**, 519-529.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, **36**, 501-509.
- Zhou, X. & Wang, Y. (2012). Probiotics in Aquaculture – Benefits to the Health, Technological Applications and Safety. In: Carvalho, D.E.(Eds). *Health and Environment in Aquaculture*, pp. 414. InTech.
- Ziggers, D. (2011) Review - European Probiotics Association revitalized. In *All About Feed*, Vol. 2, pp. 11-13.
- Zorrilla, I., Balebona, M.C., Morínigo, M.A., Sarasquete, C. & Borrego, J.J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, **22**, 167-172.

ANEXOS

ANEXO I – Determinação do LD₅₀ de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Com o objetivo de determinar a dose de patogénico a injetar no ensaio de infeção, foi necessário calcular previamente o LD₅₀, baseando-se no método de Reed & Muench (1938). Este método baseia-se na suposição de que o número de exemplares afetados varia na proporcionalidade de Log₁₀ da diluição utilizada. Assim nas diluições menores (maior concentração de bactéria) o efeito será maior do que nas diluições maiores (menor percentagem de bactéria). Além disso supõe-se que a zona próxima dos 50% de eficácia varia linearmente com a dose.

Em primeiro lugar, para calcular a percentagem de infeção foi necessário construir uma tabela em que os valores de “total de peixes” e “total de vivos” são cumulativos. Devido á suposição que a concentração maior de bactéria (10⁵ CFU mL⁻¹) teve maior efeito sobre todas as amostras com as diluições mais baixas inoculadas, do mesmo modo, considera-se que as concentrações mais baixas (10³ CFU mL⁻¹) não tiveram nenhum efeito sobre as cópias inoculadas com concentrações mais elevadas.

Tabela XIII: Cálculo da percentagem de infeção de *Phdp* para cada uma das concentrações administradas.

Concentração	Nº animais	Mortos	Vivos	Mortos totais	Vivos totais	Mortos/ Total	% Eficiência*
10 ³	10	7	3	7	5	7/12	35
10 ⁴	10	8	2	15	2	15/17	88
10 ⁵	10	10	0	25	0	25/25	100

* Nº total mortos dividido pelo nº total de peixes multiplicado por 100

As percentagens de valores obtidos são ligeiramente diferentes dos cálculos com o número de mortos a respeito da mortalidade cumulativa apresentada na figura 10. Assim, calculamos a diferença proporcional entre as concentrações aplicando a seguinte equação:

$$DP = \frac{50 - (\% ID - 50\%)}{(\% ID + 50\%) - (\% ID - 50\%)}$$

DP: Diferença proporcional

%ID + 50%: Eficiência produzida pela concentração que provoca mortalidade imediatamente acima dos 50%

%ID - 50%: Eficiência produzida pela concentração que provoca mortalidade imediatamente abaixo dos 50%

Com esta fórmula determina a diferença proporcional (DP = 0,28). De seguida calculamos o LD₅₀ seguindo a fórmula:

$$LD_{50} = \text{Log} (ID - 50\%) + DP$$

ID - 50%: concentração que provoca mortalidade imediatamente abaixo dos 50%

Como o $\log (10^3) = 3$, obtemos um LD₅₀ de *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* para linguados senegalês de peso entre os 13 e 16g de $10^{3,28}$, o que equivale aproximadamente a $1,9 \times 10^3$.

ANEXO II – Contagem de CFU de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Para determinar se a concentração de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizada para infectar os juvenis, foi necessário realizar a contagem de CFU da suspensão preparada para infectar os juvenis. Da concentração de 10^4 foram preparadas diluições sucessivas (1:10 e 1:100), de forma a permitir a contagem entre 30 a 300 colónias. Para cada uma das diluições foi semeado um volume de 0,1 mL em duas placas que foram incubadas durante 48h a 22°C.

Tabela XIV: Contagem de CFU de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* preparados para infecção de juvenis.

Concentração	Diluição	Amostra	CFU	Média de CFU
10^4	1:10	A	>300	>300
	1:10	B	>300	
	1:100	A	258	243
	1:100	B	227	

Decorrido o tempo de incubação, contaram-se o número de colónias formadas em cada placa e calculou-se o número de CFU mL⁻¹ a partir da seguinte equação:

$$\begin{aligned} CFU \text{ mL}^{-1} &= N^{\circ} \text{ de colónias} \times \left(\frac{1}{\text{fator de diluição}} \right) \times \left(\frac{1}{\text{Volume semeado (mL)}} \right) = \\ &= 243 \times \left(\frac{1}{100} \right) \times \left(\frac{1}{0,1} \right) = 24,3 \end{aligned}$$

Como se contaram 243 colónias na diluição 1:100, assim em 1 mL da concentração injetada nos juvenis estariam 24,3 CFU. Ou seja, na realidade nos ensaios de infecção realizados os juvenis foram infectados com uma concentração de $2,43 \times 10$ CFU mL⁻¹ de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.