

# Microbiologia a Serviço da Piscicultura: Estabelecendo Melhores Resultados com Responsabilidade e Segurança

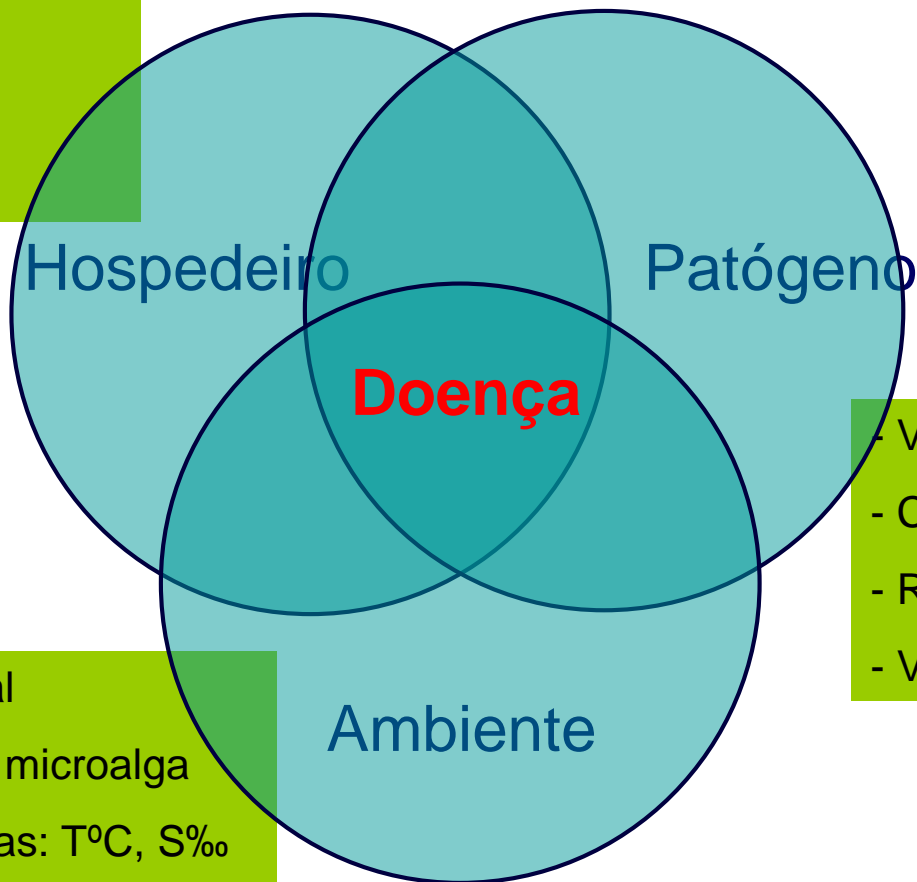
**Dr. Marcos Santos, Dr. Olivier Decamp, Tadeu Silva e Liélio Cunha**

**INVE Aquaculture**

# Interação hospedeiro -patógeno-ambiente

Risco de doenças sempre presente, mas podemos minimizá-lo, ou reduzir seus efeitos, **dependendo de como manejamos o cultivo**

- Nutrição
- Genética
- Estresse Fisiológico



- Vetores
- Concentração
- Resistência
- Virulência

- Alimento Natural
- Estabilidade da microalga
- Variações amplas: T°C, S‰
- Matéria orgânica: H<sub>2</sub>S, ↓O.D, NH<sub>3</sub>

# Métodos de Produção de peixes e Desafios em Relação à Sanidade Animal

	Tq rede (rios/ áreas abertas)	Tq rede (açudes/lagos)	Viveiros escavados	Sistemas de recirculação “fechado”
<b>Biosegurança</b>	impossível	impossível	possível	possível
<b>Controle de resíduos</b>	possível	possível, dependente do número de tanques-rede	Requerido e Controlável	desafiante

# TR= sistemas intensivos de produção

Desafio constante!!!  
Qualidade d'água  
Alimentação/nutrição  
estresse



# Enfermidades em Tilápia



- Bactérias associadas com doenças em tilápia incluem *Streptococcus agalactiae* e *S. iniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus* sp, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus* sp, *Pseudomonas* sp, etc.



- Mortalidades também associada com estresse, principalmente devido a variações ambientais e manejo inadequado, i.e. baixo O.D, variações de temperatura, elevação da amônia, etc.

# Podemos melhorar a sanidade animal na piscicultura?



**Sim!! O setor tem trabalhado para isso.**

**Não existe uma solução milagrosa, mas sim um conjunto de medidas preventivas , incluindo:**

- Manejo adequado: transporte, classificação, alimentação
- Viveiros: controlar a qualidade de água e solo
- Assegurar nutrição de qualidade
- Uso de imuno-estimulantes
- Vacinação
- **Uso da microbiologia: seleção de probióticos adequados**

# Produtos comerciais com baixa eficiência



1. **Forma equivocada de uso** : probióticos não são antibióticos, portanto não funcionam se usados como agentes terapêuticos.

**Probióticos: Uso preventivo e ao longo de todo o cultivo**

2. **Produtos ineficientes comercializados**

**Causas:**

- Linhagens ou espécies de bactérias inadequadas
- Modo de atuação ou interação das bactérias
- Baixa concentração de bactérias viáveis (UFC/g) no produto comercial acompanhado de baixas dosagens aplicadas

# Probióticos na Tilapicultura em Tanque-rede



- Aumento do “bem-estar” do peixe: cor, comportamento, apetite, resistência ao manejo e aos desafios ambientais
- **Maior sobrevivência** durante: reversão em hapas, juvenis em bolsão (alevinão) e engorda em tanques-rede.
- **Redução significativa no FCA** em condições ambientais desafiadoras (alta T°C e baixo O.D.), representando menor aporte de nutrientes da ração para o ambiente.
- Menor incidência de **doenças bacterianas**
- Redução do sabor a lama/barro (**off-flavor**)



## Tipos de probióticos

- Gama variada de gêneros/espécies u
- Seleção de cepas com base na:

**Na disponibilidade:** mais frequente em animais terrestres ou humanos; a (tratamento de esgoto) OU

**No desempenho para peixes e**

- Variada forma de apresentação do produto:

- líquido, refrigerado ou em pó
- linhagem pura, mistura definida
- baixa ou alta concentração
- fermentação e ou ativação prévia ou de uso direto



# Confuso

# USO DE PROBIÓTICOS NA PISCICULTURA

**Bacillus:** bactérias naturais das populações de peixes e crustáceos, e do ambiente aquático.

## **RAÇÃO (em VIVEIROS e TQ-REDE)**

- MELHORA SISTEMA IMUNOLÓGICO
- OTIMIZA A ASSIMILAÇÃO DE NUTRIENTES DA RAÇÃO
- COMPETE CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

## **ÁGUA E SOLO (em VIVEIROS)**

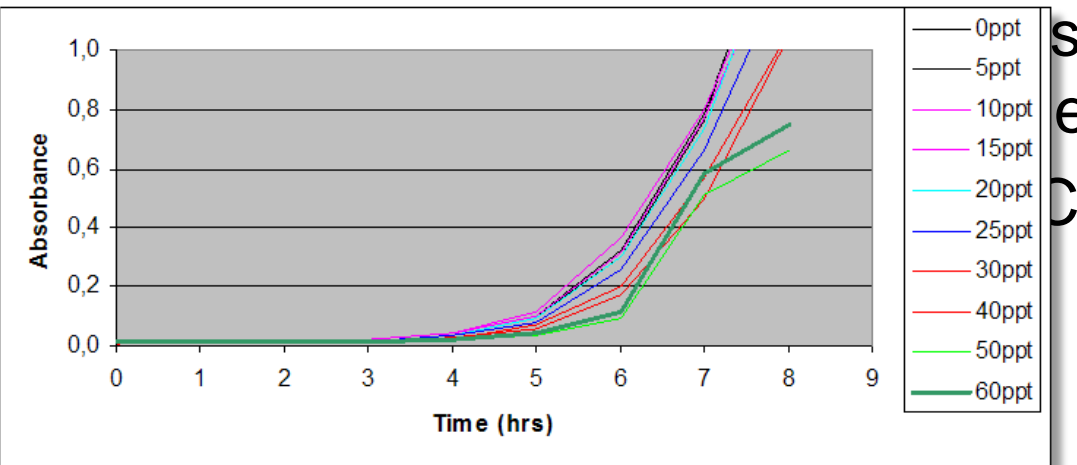
- ACELERA A DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS
- RECICLA NUTRIENTES AUXILIANDO NA ESTABILIDADE DO FITOPLANCTON

# Probióticos comerciais em pó

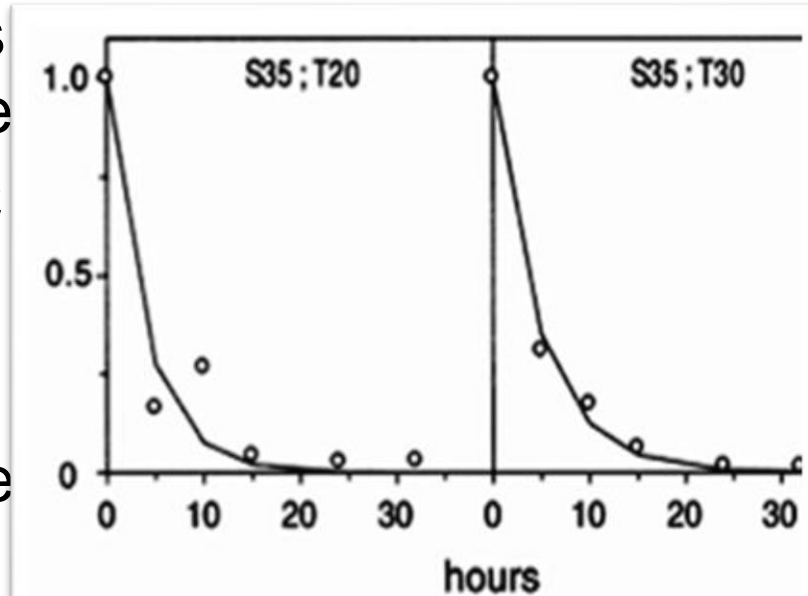
- Composição padrão (linhagens obtidas de coleção de cultura)
- Concentração UFC/g não varia de lote para lote
- Não precisa fermentar → sem riscos de contaminação
- Armazenamento simples e viabilidade longa
- Uso direto, com custo reduzido de mão de obra

→ Ferramenta ideal para a aquicultura

# Atividade sob condições ambientais variadas



Condição aeróbica e anaeróbica



Survival of *Lactobacillus casei* in seawater at 20 and 30°C.

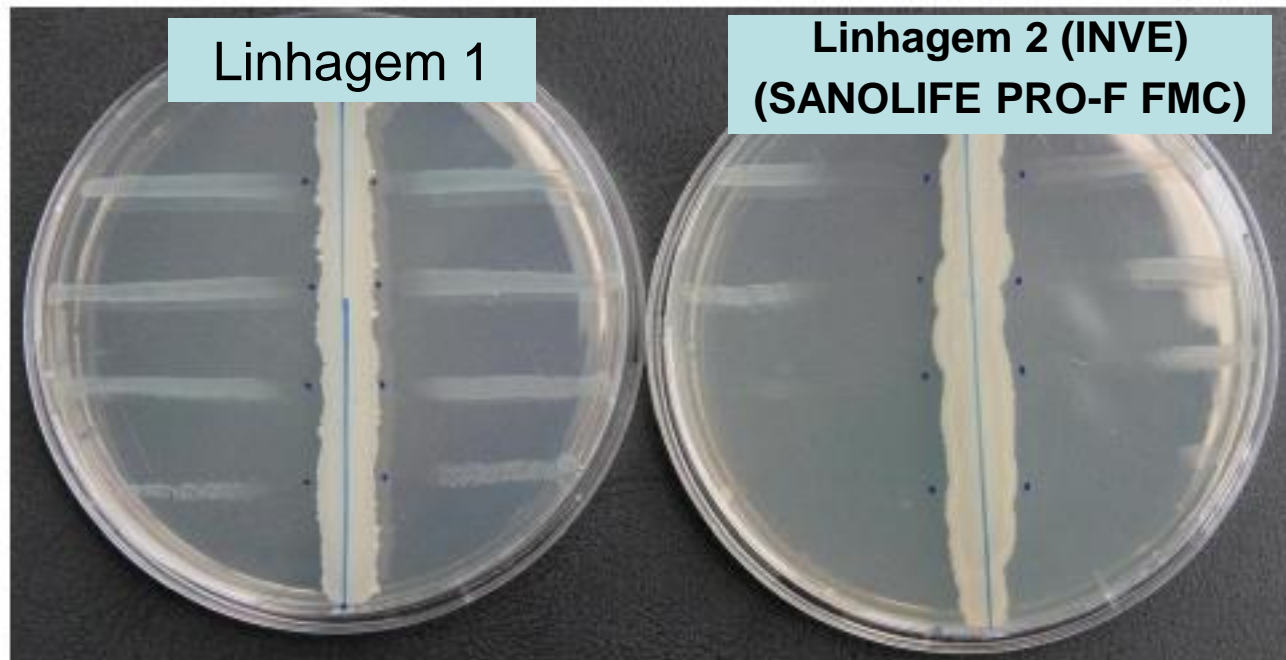
Vasquez *et. al.* 2003: Current Microbiology Vol. 47, p 508

# Bacillus: Atividade contra bactérias patogênicas

## Exemplos de Patógenos de peixes diretamente inibidos pelas linhagens de *Bacillus* selecionados

Fish species	Pathogen
Japanese flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	<i>Vibrio</i> spp.
Gizzard shad ( <i>Konosirus punctatus</i> )	<i>Vibrio</i> sp.
Gilthead seabream ( <i>Sparus aurata</i> )	<i>Vibrio harveyi</i>
	<i>Vibrio proteolyticus</i>
	<i>Vibrio</i> spp.
Rainbow trout ( <i>Salmo gairdneri</i> )	<i>Listonella anguillarum</i>
Herring ( <i>Clupea harengus</i> )	<i>Photobacterium illopiscarum</i>
European seabass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	<i>Vibrio</i> spp.
Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>Vibrio</i> spp.
Pacific cod ( <i>Gadus macrocephalus</i> )	<i>Vibrio logei</i>
Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	<i>Vibrio fortis</i>
Coho salmon ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	<i>Vibrio ordali</i>
Croaker ( <i>Micropogon opercularis</i> )	<i>Vibrio</i> sp.
Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	<i>Streptococcus</i> spp.
Channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	<i>Edwardsiella</i> sp.

## *Bacillus*: Atividade contra bactérias patogênicas de peixes



Meio TSA incubado por 24 h após plaqueamento de linhagens diferentes de *Streptococcus iniae*

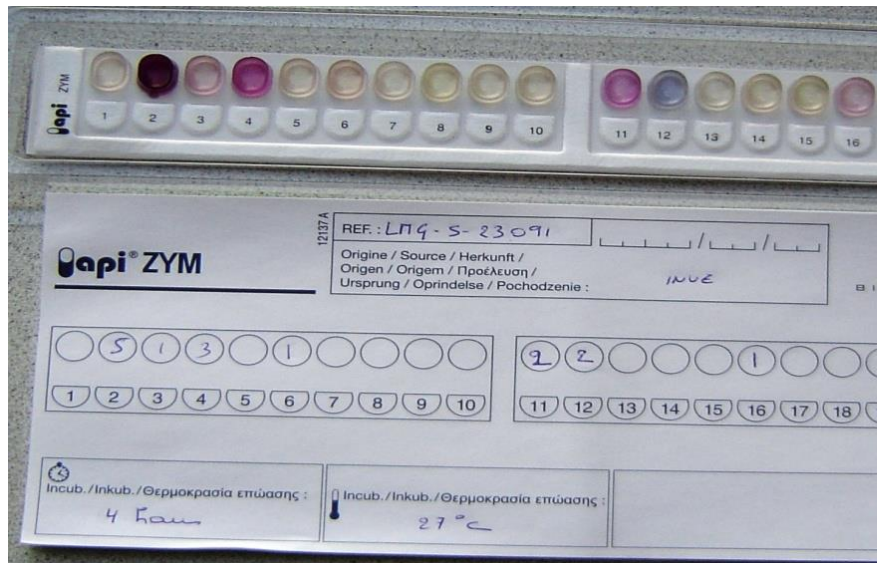
## *Bacillus* selecionados: enzimas

*Bacillus* liberam enzimas extracelulares para quebrar partículas, aumentando sua disponibilidade para absorção.

### **Enzimas** produzidas pelos **Bacillus Sanolife**:

- **proteases** (restos de ração, fezes, peixes mortos, etc)
- **amilase** (ração não consumida)
- **celulose** (restos de algas e plantas, restos de ração)
- **xilanase** (restos de algas e plantas, restos de ração)
- **mananase** (restos de algas e plantas)

## BACILLUS: Produção de exo-enzimas



Ghent, November 2006

REPORT ON ENZYMATIC ACTIVITY OF SANOLIFE BACILLUS STRAINS

Trials carried out at the Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, University of Ghent, under contract research for INVE Technologies SA, Dendermonde, Belgium and coordinated by Dr Olivier Decamp.

OBJECTIVE:

To confirm the production of enzymes by Bacillus strains provided by INVE Technologies.

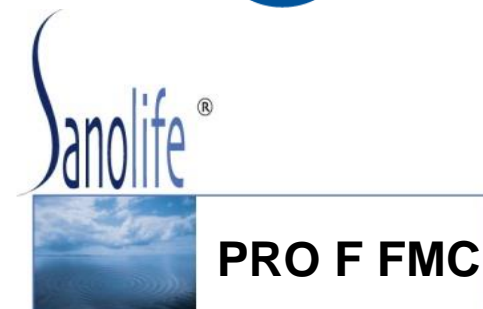
- Benefício direto na otimização da ração ( **redução do FCA** ).
- Benefício indireto ao ambiente ( **redução da M.O.** )



## Benefício nutricional das proteases

- Melhor uso do potencial de nutrientes dos ingredientes.
- Mais proteína digerível → > peptídeos, aa → aumento da absorção e do crescimento.
  
- Melhor crescimento e digestibilidade com adição de protease, xilanase e beta-glucanase. (Lin et al., 2007)
- Aumento na altura dos villi intestinais em truta arco-íris suplementadas com protease (Guajardo et al., 2006)

## Aplicação na ração pela Fábrica



- Sem trabalho para o produtor
- Aplicado no banho de óleo (“top coating”) ao final do processo
- Padronização e facilidade para a fazenda
- Sem perdas no armazenamento da ração durante meses.



# Probiótico na ração de tilápia juvenil Lab. SBBU (Tailândia)



Tilápia (*O. niloticus*) (alevinos com 2-5 cm), em taques de 220 L, sistema estático. Densidade de 15 alevinos/tanque.



Ração CP c/ 30% de proteína, 3X/dia. Teste de 8 semanas.

2 tratamentos em triplicata:

- T. A: ração controle (sem probiótico)
- T. B: ração com *Bacillus Sanolife* (200g/ton).

# Probiótico na ração de tilápia juvenil Lab. SBBU (Tailândia)



Peso médio corporal de tilápia (g)

Tratamento	semana 0	semana 4	semana 8
Controle	1,99 ± 0,28 <sup>a</sup>	16,29 ± 3,05 <sup>a</sup>	47,76 ± 9,23 <sup>a</sup>
Sanolife	2,00 ± 0,29 <sup>a</sup>	17,57 ± 3,72 <sup>a</sup>	52,28 ± 11,21 <sup>b</sup>

Letras diferentes a mesma coluna indica diferença significativa ( $p < 0,05$ )

9,5%

Juvenis mais robustos

# Probiótico na ração de tilápia

## Engorda TR- Castanhão, CE, Brasil



- Fazenda Jaburu, Nova Jaguaribara/CE
- 4 Tanque-rede (3x2x1,5m)/tratamento
- Ração: 4mm, 4-6mm (Pratigi Alimentos)
- Teste sob desafio ambiental, alta T°C e ventos fortes

	Probiótico	Controle
Dose	200g/ton Sanolife PRO F FMC	-----
Duração	54 dias	59 dias
Sobrevivência	92%	84%
FCA	1,71	2,42

**Melhor aproveitamento do potencial nutricional da ração e um melhor estado de saúde dos peixes**

# Tilapia – Bacillus em reprodutores



- Controle, Continuo ou alternado (ciclo de 7 dias com ou sem ingestão de probiótico)
- Dose de 500 g/ton de ração (probiótico com  $10^{10}$  UFC/g) → na ração  $5 \times 10^6$  UFC/g

## Reproductive performance of tilapia females, *Oreochromis niloticus*, fed probiotics

Danielle de Carla Dias<sup>1\*</sup>, Leonardo Tachibana<sup>1</sup>, Guilherme S. Telli<sup>2</sup>, Edson F. Machado<sup>3</sup>, Mariana M. Evangelista<sup>1</sup>, Raissa B. Cavalcante<sup>1</sup>, Eliana Oshiro<sup>3</sup>, Jessica N. de Lima<sup>3</sup>, Fabio R. Sussel<sup>3</sup>, Elizabeth Romagosa<sup>1</sup>, Maria José T. Ranzani-Paiva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fishery Institute – São Paulo - Brazil

<sup>2</sup> Aquaculture Center UNESP – Brazil

<sup>3</sup> APTA Pirassununga - Brazil

	Controle	Contin probiotic	Altern. probiotic
Nº total de ovos	10.851	25.650	26.153
% de fêmeas desovantes	33,30%	69,40%	69,40%

# “Bem estar”

## Ação immunoestimulante em peixes

### Bacillus e o sistema imune de peixes

#### ***Bacillus subtilis.***

-Aumento da queima respiratória, atividade bactericida sérica, aderência de neutrofilos e de lisozima em tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Aly et al. 2008. Fish Shellfish Immunol 25:128-136.**

-Aumento da queima respiratória e da atividade bactericida sérica em *Labeo rohita*. **Kumar et al. 2008. Fish Shellfish Immunol 24:168-172.**

-Aumento do muco intestinal, lisozima sérica, queima respiratória e atividade fagocitária em *Oncorhynchus mykiss*. **Newaj-Fyzul et al. 2007. J Appl Microbiol 103:1699-1706.**

#### ***Bacillus pumilus***

- Aumento na atividade e eficiência fagocítica e nos níveis do ânion superóxido de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Srisapome et al. 2011. Proceedings of the 49th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart University, Thailand, Volume 3. Subject: Fisheries 2011 pp. 73-82**

Aumento da atividade fagocítica, atividade da lisozima sérica de garoupa (*Epinephelus coioides*). **Sun et al 2010. Fish & Shellfish Immunol 29:803-809**

# Probiotico nos viveiros

Acelera a degradação da matéria orgânica

Application of water probiotic





# Uso de probiótico na água/solo de viveiros

Viveiro após a despesca

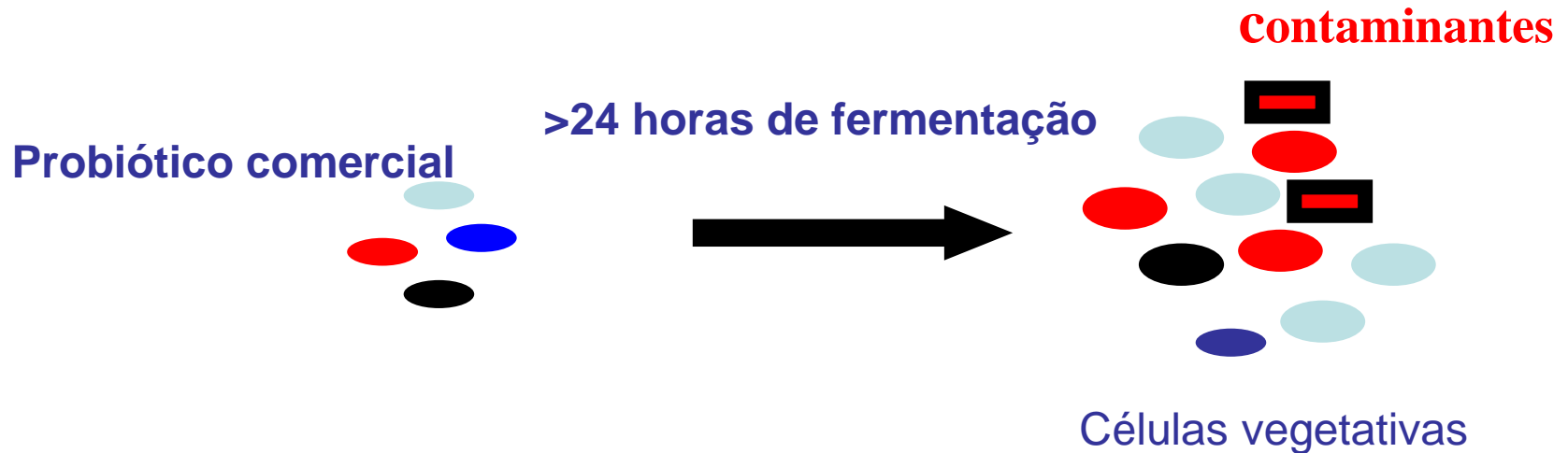


- Melhor estabilidade das microalgas
- Bom controle das cianobactérias
- Controle do acúmulo de M.O. no fundo do viveiro
- Elimina H<sub>2</sub>S e Amônia

# Probióticos: Segurança

**Fermentação: afeta a composição original das linhagens/espécies contidas no produto comercial e representa risco de propagar problemas**

⇒ >24h fermentação de produto Probiótico:

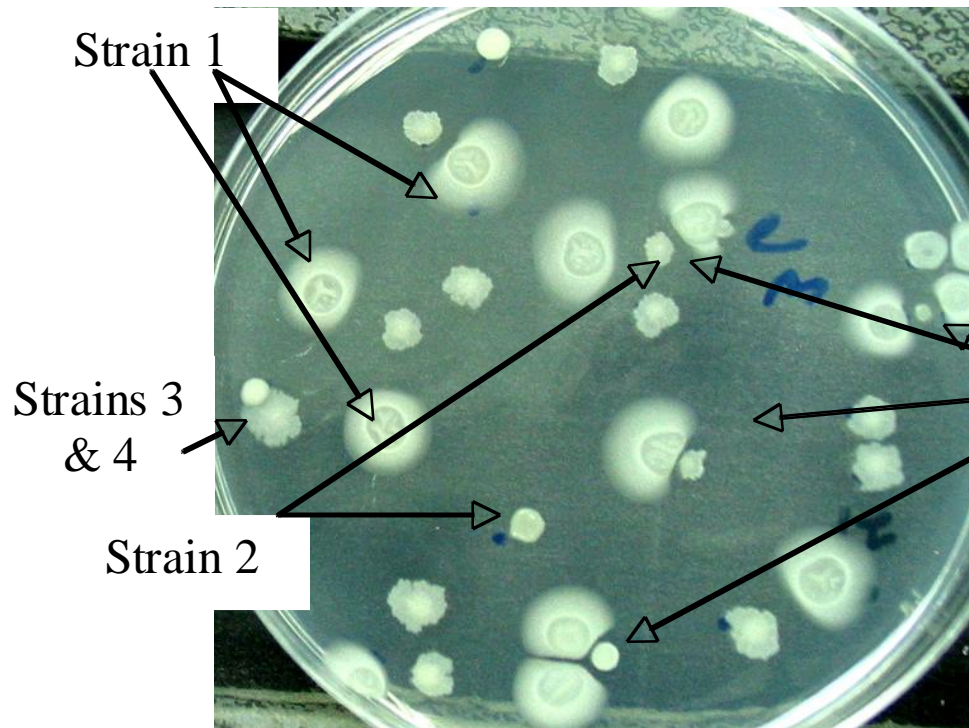


⇒ **Perigo de contaminação com bactérias patogênicas!**

⇒ **Seleção possível : mistura desproporcional**

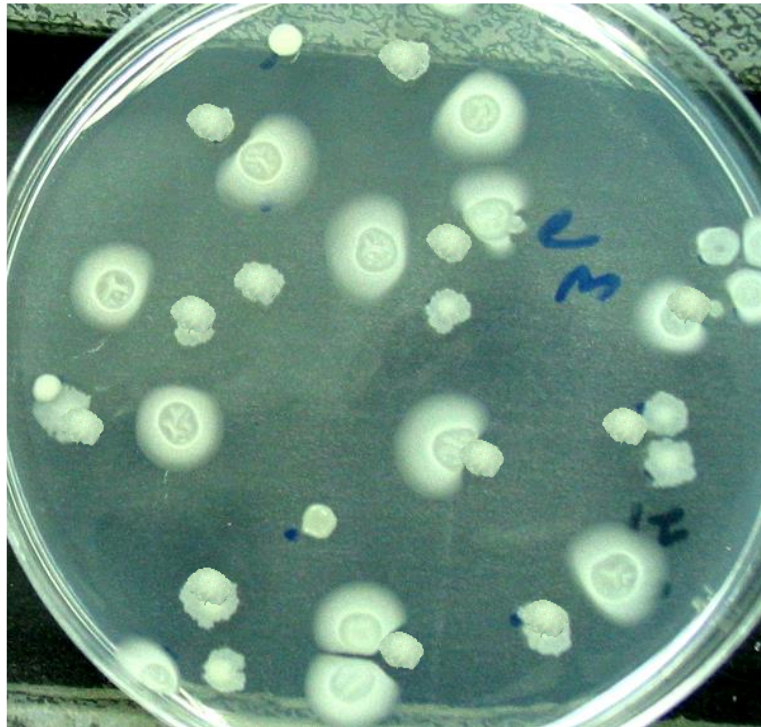
# Não fermentar produtos concentrados

## As linhagens presentes de *Bacillus* competirão entre si



The growth of Strain 1 with large colonies is inhibited when it is close to Strain 2.

Não fermentar produtos concentrados  
As linhagens presentes de *Bacillus*  
competirão entre si



Após algumas horas  
apenas 1 linhagem  
prevalecerá sobre as  
demais

O benefício da mistura  
de cepas de *Bacillus*  
será perdido

# Probióticos: Segurança

- Produtos sejam **registrados** localmente para uso específico, no caso para **aquacultura**.
- Tenha a certeza que o fornecedor tenha completo controle sob a formulação (linhagens) e rigoroso controle de qualidade a fim de que possa confirmar a **pureza** (ausência de contaminantes), **segurança** (livre de OGM e de genes de resistência a antibióticos) e **eficiência** das linhagens individuais e do produto comercial final.

# Probióticos: Segurança x *B. Cereus*



EFSA Journal 2012;10(10):2924

## SCIENTIFIC OPINION

**Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus cereus*) as a feed additive for sows, piglets, pigs for fattening, cattle for fattening, calves for rearing, chickens for fattening and rabbits for fattening<sup>1, 2</sup>**

**EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)<sup>3, 4</sup>**

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

“However, the **strain shows resistance to two antibiotics**, one of which at least can be ascribed to an acquired resistance. For this reason the FEEDAP Panel considers it inadvisable to introduce into target species a resistance determinant capable of transfer to other bacterial strains. Analysis of the complete genome sequence showed that **the strain harbours all of the genes coding for non-haemolytic and haemolytic enterotoxins**. Since the two operons present the same organisation as pathogenic *B. cereus* strains and since no mutation affecting transcription or translation has been detected, it has to be assumed that the Toyocerin® **strain has the capacity to elaborate functional toxins and, thus, to pose a hazard for those exposed to the organism. This would include those handling the additive and consumers inadvertently exposed to contaminated animal products**”

# Considerações Finais

- Não existe produto milagroso. Os micro-organismos probióticos não substituem as “boas práticas de manejo” (BPM). São parte integrante desta!
- Sucesso na produção é vinculado a sistemática de uso (profilático e não terapêutico) e do emprego de produtos concentrados, seguros e desenvolvidos especificamente para problemas específicos de peixes e camarões.
- Uso dos probióticos na fabricação de rações não envolvem trabalho adicional para a fazenda e tampouco manejo diferenciado aos animais cultivados.
- Sua forma de uso (ração) não oferece estresse aos animais, mesmo sob condições de desafios ambientais, onde outras intervenções (vacinação) temporariamente não são aconselháveis.



Obrigado!

E-mail: [m.santos@inve.com.br](mailto:m.santos@inve.com.br)  
[t.silva@inveaquaculture.com](mailto:t.silva@inveaquaculture.com)  
[l.cunha@inveaquaculture.com](mailto:l.cunha@inveaquaculture.com)