



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA**

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA E CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE HEMÓCITOS DE JUVENIS DE *Macrobrachium rosenbergii* MANTIDOS EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Vibrio parahaemolyticus*.

GISELY KARLA DE ALMEIDA COSTA

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do Bacharel em Engenharia de Pesca.

**Prof.^a Dr.^a Suzianny Maria Bezerra
Cabral da Silva
Orientadora**

**Recife,
Novembro/ 2019**

Dados Internacionais de Catalogação
na Publicação Universidade
Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

- C837e Costa, Gisely Karla de Almeida
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO NA TAXA DE
SOBREVIVÊNCIA E CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE HEMÓCITOS DE JUVENIS DE
Macrobrachium rosenbergii MANTIDOS EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Vibrio parahaemolyticus*. /
Gisely Karla de Almeida Costa. - 2019.
27 f.
- Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suzianny Maria Bezerra
Cabral da Silva. Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Engenharia de Pesca, Recife, 2019.
1. Bacillus. 2. Camarão. 3. Desafio. 4. Bacteriano. 5. Vibrio. I. Silva, Prof^ª. Dr^ª. Suzianny Maria
Bezerra Cabral da, orient. II. Título
-

CDD 639.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA**

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA E CONTAGENS TOTAL E DIFERENCIAL DE HEMÓCITOS DE JUVENIS DE *Macrobrachium rosenbergii* MANTIDOS EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Vibrio parahaemolyticus*.

Gisely Karla de Almeida Costa

ESO/TCC julgado adequada para
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Pesca. Defendida e
aprovada em __/__/____ pela seguinte
Banca Examinadora.

Prof^a. Dr^a. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva
(Orientadora)
[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof^a Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra
(Membro titular)
[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos
(Membro titular)
[Departamento de Medicina Veterinária]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Me. Renata da Silva Farias
(Membro suplente)
[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Dedicatória

A minha mãe Lenilda, meu pai Marcelino, e avó Severina (in memoriam) pelos conselhos, incentivo, e por terem acreditado em mim desde o começo.

Agradecimentos

A Deus!

A minha família por toda compreensão e amor;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida no período de 2018-2019;

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA pelo material cedido;

Aos professores envolvidos no curso de Engenharia de Pesca, pelas disciplinas ofertadas;

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, não tenho palavras pra expressar minha gratidão por todos os conselhos, orientações, apoio, pela enorme paciência e por me ajudar no crescimento pessoal e profissional;

Aos funcionários e professores do DEPAq, pela ajuda, e ensinamentos ao longo da minha graduação;

Aos colegas do LASAq, Júlio Neves, Flávia Abreu, Allyne Elins, Katharine Batista, Albery Correia, Igor Felix, e Yago Vilarim. Pelas contribuições ao projeto, sem vocês eu não teria chegado até o fim;

Aos colegas da graduação pelo bom companheirismo, e risos proporcionados;

A minha namorada Wilka Granjeiro, que esteve sempre do meu lado, não me deixando abater nos momentos difíceis.

Enfim, a todos (as) que de forma direta ou indireta participaram, incentivaram e acreditaram no alcance de meus objetivos.

Resumo

O presente trabalho avaliou o efeito da suplementação dietética de cepas probióticas nas contagens total e diferencial de hemócitos e sobrevivência em juvenis de *M. rosenbergii*. Foram ofertadas cinco dietas experimentais contendo cepas do gênero *Bacillus* candidatas a probiótico acrescidas à ração comercial (35% PB), sendo uma dieta controle e, quatro, submetidas à suplementação (IPA122; IPA240; IPA122+IPA240 e; probiótico comercial), com três repetições cada. Os animais foram acomodados em unidades experimentais com 40 L, com 30 camarões por unidade, sob aeração constante, e peso médio inicial de 0,3g. A oferta das dietas suplementadas teve duração de 30 dias, quando os animais foram alimentados três vezes ao dia a 8% da biomassa. Após esse período foi efetuado o desafio bacteriano com o *V. parahaemolyticus* por 21 dias quando foram testadas duas vias de infecção, ingestão e injeção do material infeccioso. Ao final de ambas as etapas, os animais (1 por unidade experimental) tiveram a hemolinfa coletada para determinação das contagens de hemócitos, e ao final do desafio foi calculada a mortalidade para cada tratamento. Os resultados obtidos demonstraram que os valores médios referentes à contagem total de hemócitos antes do desafio apresentaram valores mínimos e máximos variando entre $7,5 \times 10^6$ e $3,98 \times 10^7$ hemócitos/mL, entretanto não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Para a contagem diferencial de hemócitos foram identificados três tipos de células, hialinas, células semi-granulares e células granulares, contudo não foi identificada diferença significativa entre os valores percentuais médios obtidos dentre os tratamentos ($p > 0,05$). Pós-desafio, a contagem total de hemócitos do tratamento 122+240 obteve uma das menores concentrações de células/ml em ambas as vias de infecção testadas. A contagem diferencial de hemócitos apresentou um perfil de concentração dos diferentes tipos de células distinto para cada via de infecção avaliada, na qual, a via injeção obteve um maior número de células semi-granulares, e a via de infecção ingestão uma maior concentração de células hialinas, os tratamentos 122+240 e 240 obtiveram uma maior concentração de células hialinas, esses resultados refletem na mortalidade encontrada para cada tratamento onde essas cepas (122+240 e 240) demonstraram a menor mortalidade, indicando que a suplementação com a cepa 122+240 apresenta um melhor desempenho imunoprotetor em um cenário de infecção de juvenis de *M. rosenbergii* com o *Vibrio parahaemolyticus*.

Palavras-chave: *Bacillus*, Camarão, Desafio, Bacteriano, *Vibrio*.

Lista de figuras

	Página
Figura 1 - Fluxograma preparação da ração.	5
Figura 2 - Ilustração cavidade cardíaca.	7
Figura 3 - Hemócitos do <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .	9

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1 – Valores médios, desvio padrão, valores mínimos e máximos da contagem total de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do período de oferta do probiótico	8
Tabela 2 – Valores médios da contagem diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do período de oferta do probiótico.	10
Tabela 3 – Valores médios, desvio padrão, valores mínimos e máximos contagem total de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do desafio bacteriano.	11
Tabela 4 – Valores médios, mínimos e máximos da contagem diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do desafio bacteriano.	12
Tabela 5 – Mortalidade acumulativa dos diferentes tratamentos desafiados via injeção do material infeccioso.	13
Tabela 6 – Mortalidade acumulativa dos diferentes tratamentos desafiados via ingestão do material infeccioso.	14

Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Metodologia (Material e Métodos).....	4
3.1. Dietas Experimentais.....	4
3.2. Condições experimentais.....	5
3.3. Cultura bacteriana - material infeccioso.....	6
3.4. Desafio bacteriano.....	6
3.5. Coleta de hemolinfa.....	6
3.6. Contagem total e diferencial de hemócitos.....	7
3.7. Análise estatística.....	7
4. Resultados e discussão.....	8
5. Cronograma de execução.....	15
6. Considerações finais.....	15
7. Referências bibliográficas.....	16
8. Dificuldades encontradas.....	19
9. Parecer do orientador.....	19

1. Introdução

A carcinicultura de água doce é um dos setores da aquicultura que mais cresce no mundo, tendo como principais representantes camarões do gênero *Macrobrachium* (NEW e NAIR, 2012), com um maior destaque para a espécie *Macrobrachium rosenbergii*, que segundo estimativas representou aproximadamente 46% (234 mil toneladas) da produção mundial do setor em 2016 (FAO, 2018).

No Brasil, o *M. rosenbergii* é uma das principais espécies de água doce cultivada em escala comercial (NEW e KUTTY, 2010) devido às suas características biológicas, como o rápido crescimento, onivoria e rusticidade (SANTOS, 2013), além de uma boa aceitação no mercado, que nos últimos anos vem se expandindo e acarretando em um aumento na demanda por esses animais, que por consequência promove melhorias na cadeia produtiva (MARQUES e MORAES-VALENTI, 2012).

Uma dessas melhorias seria a mudança nos sistemas de cultivo, que eram caracterizados pela baixa densidade (até 20 camarões/m²) devido ao perfil territorialista e agressivo dos camarões (VALENTI et al, 2009), mas que atualmente há estudos que atestam a viabilidade do cultivo em densidades de até 50 camarões/m² em sistemas superintensivos (BALLESTER et al., 2017; NEGRINI et al, 2017), promovendo um impacto positivo na produtividade (NEGRINI, 2017). Entretanto, maiores densidades aumentam a possibilidade de surto de várias doenças decorrente do maior adensamento, sendo as bactérias, um frequente agente patogênico neste cenário (DEBNATH, et al 2012; WALKER e WINTON, 2010).

Naturalmente, os camarões detectam esses agentes patogênicos através do reconhecimento das paredes celulares dos invasores e os removem ao longo de uma série de mecanismos imunológicos (LEE, SOH, e WU, 2001), onde os hemócitos – células que compõe o sistema circulatório dos invertebrados – entram em contato direto com a célula patogênica através das reações de defesa celular, como a fagocitose, encapsulamento, e formação de nódulos (BACHÈRE, 2000; ROWLEY, 2016).

Uma das alternativas para auxiliar esse processo é o uso das bactérias probióticas que agem através de vários mecanismos, como a exclusão competitiva, impedindo a aderência na mucosa intestinal; liberação de metabólitos protetores do intestino que secretam produtos antimicrobianos e enzimas bactericidas (KUMAR, ROY, MEENA, & SARKAR, 2016), além de vários estudos confirmarem o efeito positivo dos probióticos no controle imunoprolifático de doenças (APINES-AMAR e AMAR, 2015; MATHIPA, 2017).

Entretanto, apesar destes benefícios, há uma escassez de estudos disponíveis correlacionando o efeito imunestimulante das bactérias probióticas mediante uma infecção bacteriana em juvenis de *Macrobrachium rosenbergii*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito de cepas experimentais candidatas a probiótico em desafios bacterianos com *Vibrio parahaemolyticus* em sistemas de água clara.
-

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a contagem total e diferencial de hemócitos de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* diante do desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus* após a suplementação dietética com probiótico;
- Determinar a taxa de sobrevivência dos camarões desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* após a suplementação dietética com probiótico.

3. Metodologia (Material e Métodos)

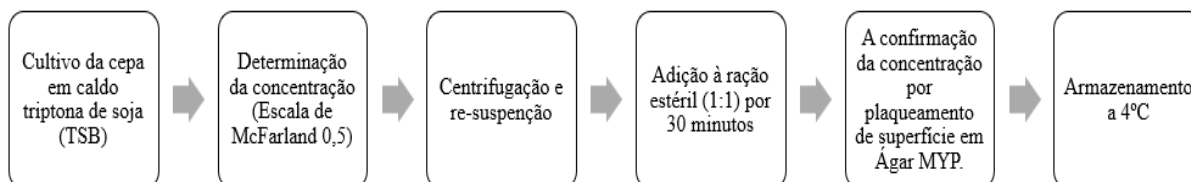
3.1. Dietas Experimentais

No presente experimento, foram ofertadas cinco dietas experimentais contendo cepas do gênero *Bacillus* candidatas a probiótico acrescidas à ração comercial (35% de proteína bruta), sendo uma dieta controle (isenção de probiótico) e, quatro, submetidas à suplementação (IPA122; IPA240; IPA122+IPA240 e; probiótico comercial). As cepas foram provenientes do banco de cepas do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), e gentilmente cedidas para a execução deste projeto.

Para elaboração das dietas experimentais (suplementadas), as bactérias das diferentes cepas foram cultivadas em caldo tripton de soja (TSB) até a concentração de 10^8 UFC/ml. A determinação da concentração foi realizada através da escala de McFarland (0,5). Em seguida, as culturas foram centrifugadas, decantadas e re-suspendidas para posterior adição à ração estéril (1:1) por 30 minutos. A confirmação da concentração bacteriana de 10^8 UFC/g nas rações foi efetuada através do método de plaqueamento de superfície em Ágar MYP (Ágar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina). As rações foram armazenadas a 4°C até sua oferta aos animais (Figura 1). A ração do controle e do probiótico comercial possuíam o mesmo método

de preparação das dietas suplementadas, mas a cepa do probiótico comercial foi ativada de acordo com o fabricante. No caso da dieta do grupo controle, a cultura bacteriana foi substituída por solução salina a 2%.

Figura 1 - Fluxograma preparação da ração.



3.2. Condições experimentais

Para a condução do experimento, juvenis de *M. rosenbergii* (peso médio inicial de 0,3 g) foram adquiridos de fazenda comercial e, distribuídos aleatoriamente em unidades experimentais de 40 L de volume útil, abastecidas com água doce filtrada a 30 µm e previamente tratada com cloro a 30 ppm, na densidade de 3 camarão / 4L sob aeração constante.

As unidades experimentais foram mantidas com alcalinidade e dureza acima de 60 mg de CaCO₃/L e temperatura de 28°C. As dietas experimentais (suplementadas) foram avaliadas através de um delineamento com cinco tratamentos: IPA122, IPA240, IPA122 e IPA240, probiótico comercial e o grupo controle - sem probiótico, com três repetições cada, perfazendo 15 parcelas.

A oferta teve uma duração de 30 dias onde os animais foram alimentados com as dietas experimentais a 8% da biomassa três vezes ao dia (8, 12 e 16 horas), sendo a quantidade ofertada ajustada de acordo com a estimativa de consumo, mortalidades e sobras segundo metodologia de New et al. (2010).

Para o monitoramento das variáveis de qualidade de água dentro dos limites ideais para carídeos propostos por New et al. (2010), foram realizadas mensurações de temperatura, pH e oxigênio dissolvido (O.D.), duas vezes ao dia, e coletadas amostras de água, semanalmente, para análise de nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, alcalinidade e dureza por meio de kit colorimétrico comercial (Alcon Labcon, Camboriú, Brasil). A manutenção da limpeza das estruturas dos tratamentos aconteceu diariamente por meio de sifonamento, com reposição do volume d'água perdido.

3.3. Cultura bacteriana - material infeccioso

A cepa liofilizada *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) obtida da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foi ativada e cultivada em Caldo Triptona de Soja (TSB) suplementado com 2% de cloreto de sódio por 24 horas a 30°C. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 2200 g durante 15 minutos, o sobrenadante descartado, os pellets lavados duas vezes e finalmente re-suspensos em solução salina estéril a 2%. A concentração de 10^8 UFC/ml foi determinada utilizando-se como referência a escala de McFarland de 0,5.

3.4. Desafio bacteriano

Após a alimentação com as dietas experimentais (30 dias), os animais foram submetidos ao desafio bacteriano através de duas rotas de transmissão: (1) desafio via ingestão, no qual uma cultura de 10^7 UFC/ml do material infeccioso em solução salina a 2% foi adicionada à ração previamente esterilizada (1:1) e; (2), desafio via injeção, através da inoculação intramuscular de 10^7 UFC/ml do material infeccioso em cada animal.

Para o desafio via ingestão, a determinação da concentração bacteriana nas rações foi efetuada através do método de plaqueamento de superfície com semeadura em Ágar TCBS (Ágar Manitol Tiussulfato Citrato Bile Sacarose). Uma vez confirmada a concentração bacteriana de 10^7 UFC/g nas rações, estas foram ofertadas aos animais a 8% da biomassa em uma única oferta, após um jejum de 48 horas. No caso do desafio via injeção intramuscular, 20 µL da cultura do material infeccioso à concentração de 10^7 UFC/ml foi inoculada uma única vez no 3º segmento abdominal de cada animal com o auxílio de uma seringa de insulina.

Durante o desafio, que teve uma duração de 21 dias, os animais foram distribuídos aleatoriamente em unidades experimentais de 12 L de volume útil, abastecidas com água doce filtrada a 30 µm e previamente tratada com cloro a 30 ppm, a densidade de 4 camarão / 6L sob aeração constante, cada tratamento contou com duas réplicas de cada rota de transmissão, totalizando 20 parcelas. A alimentação foi feita com ração comercial (35% PB) a 8% da biomassa três vezes ao dia (8, 12 e 16 horas), sendo a quantidade ofertada ajustada de acordo com a estimativa de consumo, mortalidades e sobras segundo metodologia de New et al. (2010).

3.5. Coleta de hemolinfa

Ao final do experimento (após os 30 dias de oferta da dieta e ao final do desafio bacteriano que durou 21 dias, sendo este último apenas para os animais sobreviventes), os

animais (dois por unidade experimental) tiveram a hemolinfa coletada para determinação da contagem total e diferencial de hemócitos segundo Cheng e Chen (2001). A hemolinfa foi coletada na cavidade cardíaca de *M. rosenbergii* (ver figura 2) usando uma seringa de 1 ml contendo anticoagulante (0,114 M de citrato de sódio, 0,1 M de NaCl, pH 7,45) na proporção de 1:9 (v:v; hemolinfa:anticoagulante) (CHENG e CHEN, 2001).

Figura 2 - Ilustração cavidade cardíaca.



Fonte: Adaptado de Suwansa-ard et al. (2015).

3.6. Contagem total e diferencial de hemócitos

A contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada a partir de 100 μ L de hemolinfa previamente coletada com anticoagulante e uma gota desta suspensão foi adicionada a câmara de Neubauer para a contagem das células (CHENG e CHEN, 2001). A determinação do número de hemócitos foi efetuada em triplicata usando um microscópio óptico. Para a determinação da contagem diferencial de hemócitos (CDH) foi adotada a metodologia de Celi et al. (2013). Nesta metodologia, uma gota da suspensão de células de hemócitos fixada em formol 4% foi espalhada em uma lâmina e seca ao ar, em seguida, a lâmina foi imersa em metanol absoluto por 6 minutos. Depois disso, foi corada com a solução de Giemsa (diluição 1:10 por 10 minutos), desidratada com etanol a 70% por 1 min e imersa em xileno absoluto por 6 minutos. A determinação das porcentagens relativas dos diferentes tipos de hemócito foi efetuada através de observação da lâmina em microscopia ótica, também em triplicata.

3.7. Análise estatística

Os cinco tratamentos (diets suplementadas e controle) com as repetições foram arranjados em um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos aos testes de homogeneidade (teste de Levene), normalidade (teste de Shapiro–Wilk) e, posteriormente, foram submetidos à ANOVA unidirecional (NELDER e WEDDERBURN, 1972; OTT, 1993). Para a avaliação de diferenças entre as médias foi utilizado o teste de Tukey (HSD - *Honest Significant Difference*). Para todas as análises foi utilizado o nível de

significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software IBM SPSS Statistics versão 23.0.0.0.

4. Resultados e discussão

Os valores médios referentes à contagem total de hemócitos variaram entre $7,5 \times 10^6$ e $3,98 \times 10^7$ células/mL antes do desafio bacteriano, entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 1), coincidindo com resultados de Sumon et al. (2018), em um estudo com juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* ($2,56 \pm 0,41$ g) suplementados com *Clostridium butyricum*, onde foi observado que a contagem total de hemócitos não diferiu nos tratamentos com e sem probiótico.

No entanto, estes resultados contrapõem-se com os obtidos por Dash et al. (2015) que testaram o efeito da suplementação do *Lactobacillus plantarum* em concentrações de $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ UFC/g e uma dieta controle, em juvenis ($0,54 \pm 0,03$ g) de *M. rosenbergii* e concluíram que a contagem total de hemócitos foi significativamente maior nas dietas suplementadas, em comparação com a isenta de probiótico.

Em um estudo similar, também com juvenis de *M. rosenbergii* ($4,0 \pm 0,02$ g) suplementados com *Bacillus licheniformis*, nas concentrações de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^9$ UFC/g e uma dieta sem o probiótico, Ranjit Kumar et al. (2013) concluíram que a contagem total de hemócitos foi mais significativa nos tratamentos com concentrações a partir de $1,0 \times 10^7$ UFC/g, em comparação com as demais dietas.

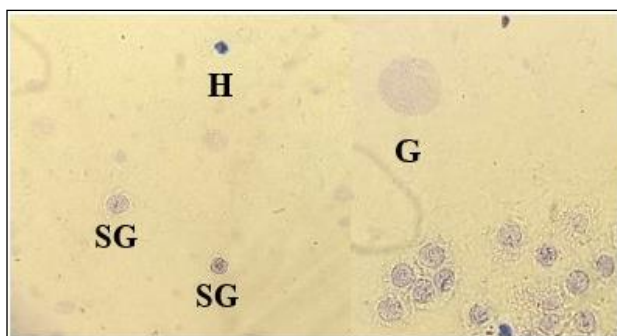
Tabela 1 – Valores médios, desvio padrão, valores mínimos e máximos da contagem total de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do período de oferta do probiótico.

Variáveis	Tratamentos				
	Controle	Comercial	122	240	122+240
	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)
Contagem Total de Hemócitos (Células/ml)	$1,47 \times 10^7 \pm 3,15 \times 10^6$ ($1,16 \times 10^7$ - $1,74 \times 10^7$) ^a	$1,10 \times 10^7 \pm 4,53 \times 10^6$ ($7,5 \times 10^6$ - $1,99 \times 10^7$) ^a	$2,35 \times 10^7 \pm 1,02 \times 10^7$ ($1,2 \times 10^7$ - $3,98 \times 10^7$) ^a	$2,28 \times 10^7 \pm 2,74 \times 10^6$ ($1,91 \times 10^7$ - $2,63 \times 10^7$) ^a	$2,01 \times 10^7 \pm 1,47 \times 10^7$ ($7,50 \times 10^6$ - $1,99 \times 10^7$) ^a

¹Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Nos crustáceos, os hemócitos circulantes classificam-se em três tipos, células hialinas que não possuem (ou possuem poucos) grânulos citoplasmáticos e estão envolvidas no processo de iniciação da coagulação da hemolinfa, células semi-granulares e células granulares que possuem grânulos citoplasmáticos abundantes e agem na defesa celular, sendo responsáveis pelos processos de fagocitose e encapsulação (HOSE et al 1990; PARRINELLO et al., 2015), no presente estudo foram identificados na contagem diferencial de hemócitos os três tipos de células (Figura 3).

Figura 3 -Hemócitos do *Macrobrachium rosenbergii*, H - células hialinas, SG- células semi-granulares, G - células granulares, Coloração (Giemsa).



Após a oferta do probiótico e antes do desafio bacteriano, as células hialinas foram encontradas em maior concentração – variando entre 88,79% e 99,54% das células contadas – e, em segundo lugar, vieram às células semi-granulares – 0,46% a 3,97%, seguidas pelas granulares – 0% a 0,72% (Tabela 2). As células hialinas são geralmente encontradas em maior quantidade no sistema circulatório do *M. rosenbergii* variando em torno de 70% das células totais (SIERRA et al., 2001). Entretanto, Sumon et al. (2018) no estudo já citado com o *M. rosenbergii* suplementados com o *Clostridium butyricum* por 60 dias, concluíram em sua contagem diferencial de hemócitos, que o número de células hialinas aumentou, enquanto células semi-granulares e células granulares diminuiram, nos tratamentos com a presença do probiótico.

Entre os tratamentos não foi encontrada diferença significativa entre os valores percentuais médios obtidos para os três tipos celulares (Tabela 2). Estes resultados corroboram com os encontrados por Sumon et al. (2018) no estudo *Clostridium butyricum* onde não foi encontrada diferença na porcentagem de células hialinas, semi-granulares e granulares nas dietas suplementadas e na dieta isenta de probióticos.

Tabela 2 – Valores médios da contagem diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do período de oferta do probiótico.

Variáveis	Tratamentos				
	Controle	Comercial	122	240	122+240
Contagem Diferencial de Hemócitos (%)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, desvio padrão, valores mínimo e máximo)
Hialinas	93,62 (91,44 - 98,58) ^a	96,67 (88,79 - 99,54) ^a	96,17 (92,55 - 98,83) ^a	95,39 (95,09 - 95,69) ^a	98,05 (96,03 - 99,23) ^a
Semi-Granulares	6,26 (1,42 - 8,26) ^a	3,30 (0,46 - 11,21) ^a	3,56 (1,40 - 6,91) ^a	4,32 (95,09 - 95,69) ^a	1,95 (0,77 - 3,97) ^a
Granulares	0,12 (0 - 0,31) ^a	0,03 (0 - 0,17) ^a	0,3 (0 - 0,72) ^a	0,29 (0,29 - 0,29) ^a	0 (0 - 0) ^a

¹Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Na contagem total dos hemócitos efetuada pós-desafio bacteriano, pôde-se observar uma mudança em relação à coleta anterior. Para os animais infectados via ingestão do material infeccioso, os valores médios dentre os tratamentos variaram entre $1,72 \times 10^6$ e $4,88 \times 10^6$ células/ml, enquanto que os animais desafiados via injeção, os valores médios permaneceram em torno de $2,07 \times 10^6$ e $6,77 \times 10^6$ células/ml (Tabela 3). Em ambas as vias, a concentração de células encontrada foi inferior a observada antes do desafio bacteriano, conforme observado em um estudo com o peneídeo *Litopenaeus stylirostris* desafiado com o *V. alginolyticus*, no qual houve uma queda na contagem total de hemócitos dois dias após a injeção do patógeno (GOARANT e BOGLIO, 2000). Uma das possíveis explicações para esse fenômeno seria o acúmulo de hemócitos no local da injeção para cicatrização das lesões – no caso da via de infecção injeção – e as atividades de defesa celular visando combater os corpos estranhos, diminuindo assim o número de hemócitos circulantes.

Para o *M. rosenbergii*, um estudo feito por Cheng e Chen (2001) revelou um aumento na contagem total de hemócitos durante as primeiras seis horas após o desafio dos animais com a bactéria *Enterococcus*, seguida de uma queda na quantidade de células circulantes após 42 horas. Além disso, já foi demonstrado para o *M. rosenbergii* que há uma correlação entre redução da contagem total de hemócitos e o aumento da susceptibilidade a infecção com o *Lactococcus garviae* (CHENG e CHEN, 2000), um fenômeno similar pode ter ocorrido no presente estudo.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para a contagem total de hemócitos ($p > 0,05$), para os animais desafiados via ingestão pertencentes aos tratamentos

com as cepas candidatas a probiótico (122, 240 e 122+240) (Tabela 3). Por outro lado, os tratamentos com o probiótico comercial e o isento de suplementação (controle) diferiram dos demais para esta contagem e apresentaram um maior valor médio de células/ml em relação aos outros tratamentos após o desafio.

Para os animais que foram desafiados via injeção do material infeccioso, não houve diferença significativa entre os tratamentos, com exceção do suplementado com a cepa 122 ($p < 0,05$) (Tabela 3), que apresentou um resultado superior com uma maior concentração de células/ml.

Tabela 3 – Valores médios, desvio padrão, valores mínimos e máximos contagem total de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do desafio bacteriano.

Variáveis	Tratamentos				
	Controle (Valor médio, valores mínimo e máximo)	Comercial (Valor médio, valores mínimo e máximo)	122 (Valor médio, valores mínimo e máximo)	240 (Valor médio, valores mínimo e máximo)	122+240 (Valor médio, valores mínimo e máximo)
Contagem Total de Hemócitos (Células/ml)	INGESTÃO				
	4,88x10 ⁶ ± 1,39x10 ⁶	4,15x10 ⁶ ± 1,58x10 ⁶	1,87x10 ⁶ ± 4,52x10 ⁵	2,01 x10 ⁶ ± 3,29x10 ⁵	1,72x10 ⁶ ± 4,29x10 ⁵
	(3,63x10 ⁶ – 6,11x10 ⁶) ^b	(2,64x10 ⁶ – 5,94x10 ⁶) ^b	(1,44x10 ⁶ – 2,43x10 ⁶) ^a	(1,49x10 ⁶ – 2,31x10 ⁶) ^a	(1,11x10 ⁶ – 2,06x10 ⁶) ^a
	INJEÇÃO				
	2,98x10 ⁶ ±8,32x10 ⁵	2,19x10 ⁶ ±8,17x10 ⁶	6,77x10 ⁶ ±2,43x10 ⁶	1,96x10 ⁶ ±4,28x10 ⁵	2,07x10 ⁶ ±7,79x10 ⁵
	(2,27x10 ⁶ – 4,13x10 ⁶) ^a	(1,44x10 ⁶ – 3,30x10 ⁶) ^a	(4,0x10 ⁶ – 8,87x10 ⁶) ^b	(1,36x10 ⁶ – 2,27x10 ⁶) ^a	(1,1x10 ⁶ – 3,01x10 ⁶) ^a

¹Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Os resultados referentes à contagem diferencial de hemócitos, também obtiveram uma mudança no padrão observado em comparação com a coleta antes do desafio bacteriano.

Após o desafio, também foi identificado os três tipos de células – hialinas, semi-granulares e granulares –, contudo, pode ser observado diferenças na proporção das células dentre os tratamentos nas diferentes vias de infecção. Para a ingestão, a proporção média das células hialinas nos diferentes tratamentos variou entre 6,0% e 89,9%, já as células semi-granulares ficaram em torno de 10,1% e 94% e não foi observada a presença de células granulares.

Os tratamentos 240 e 122+240 obtiveram uma maior abundância de células hialinas, seguidas pelas semi-granulares, com o tratamento 122+240 apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) quando comparado aos demais. A dieta isenta de suplementação, o probiótico comercial e a cepa 122 apresentaram o resultado inverso ao anterior, com uma maior proporção de semi-granulares, não sendo observadas células granulares para nenhum dos tratamentos infectados via ingestão (Tabela 4).

Os infectados via injeção apresentaram uma maior proporção de células semi-granulares, variando entre 73,1% e 93,1%, seguidas pelas hialinas – variando entre 5,9% 26,4% – e granulares – variando entre 0,5% e 2,3% –, com nenhuma diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios, mínimos e máximos da contagem diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos ao final do desafio bacteriano.

Variáveis	Tratamentos				
	Controle	Comercial	122	240	122+240
Contagem Diferencial de Hemócitos (%)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)	(Valor médio, valores mínimo e máximo)
INGESTÃO					
Hialinas	14,3 (3 – 44,3) ^a	37,1 (7,6 – 91,4) ^{ab}	6,0 (2,6 – 10,0) ^a	61,5 (47,3 – 80,4) ^{ab}	89,9 (85,0 – 93,5) ^b
Semi-Granulares	85,7 (55,7 – 97,0) ^a	62,9 (8,6 – 92,4) ^{ab}	94,0 (90,0 – 97,4) ^a	38,5 (19,6 – 52,7) ^{ab}	10,1 (5,3 – 12,4) ^b
Granulares	0	0	0	0	0
INJEÇÃO					
Hialinas	12,6 (3,3 – 36,0) ^a	5,9 (1,8 – 10,6) ^a	26,4 (3,4 – 71,7) ^a	18,5 (8,0 – 27,2) ^a	10,5 (4,9 – 24,6) ^a
Semi-Granulares	85,1 (64,0 – 92,2) ^a	93,1 (88,2 – 98,2) ^a	73,1 (28,3 – 95,9) ^a	81,2 (72,1 – 92,0) ^a	89,0 (75,4 – 95,1) ^a
Granulares	2,3 (0 – 13,3) ^a	1,0 (0,6 – 1,7) ^a	0,5 (0 – 1,7) ^a	0,2 (0 – 0,7) ^a	0,5 (0 – 1,5) ^a

¹Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ($p\leq 0,05$).

Esses resultados contrapõem-se com aqueles encontrados por Chen e Wang (2001), em um estudo com juvenis de *M. rosenbergii* infectados via injeção com *Lactococcus garvieae*, onde pós-infecção houve uma maior abundância de células hialinas ($107,28 \times 10^5/\text{ml}$), seguidas das semi-granulares ($3,30 \times 10^5/\text{ml}$) e granulares ($3,10 \times 10^5/\text{ml}$).

Nos resultados referentes à mortalidade, para os animais desafiados via injeção pôde-se observar uma alta mortalidade no primeiro dia pós-inoculação, com os tratamentos comercial e 122 apresentando uma maior proporção de mortos – 81,3%–. Os animais suplementados com a cepa 240 obtiveram um acréscimo mais lento no número de mortos em relação ao tempo quando comparado aos demais, alcançando um valor superior a 80% apenas no nono dia pós-infecção (Tabela 5). Ao final do período de desafio (21º Dia), a mortalidade acumulativa dos animais suplementados com as cepas 122 e 122+240 foram as maiores entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 – Mortalidade acumulativa dos diferentes tratamentos desafiados via injeção do material infeccioso.

Tratamentos	Nº. de animais	Mortalidade acumulativa (%)							
		1º Dia	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia	18º Dia	21º Dia
INJEÇÃO									
Controle	16	68,8	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3
Comercial	16	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3
122	16	81,3	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5
240	16	68,8	75,0	75,0	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3
122+240	16	62,5	75,0	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5

Nos animais desafiados via ingestão, o tratamento isento de suplementação (Controle) apresentou a maior proporção final de mortos, além de um acréscimo na proporção da mortalidade mais rápido que os demais tratamentos, com mortes a partir do 3º dia pós-

infecção, três dias antes que as dietas suplementadas, onde as mortes iniciaram ao 6º dia. O tratamento 122+240 obteve a menor mortalidade durante todo o período experimental, chegando ao final do desafio (21º dia), com 25% de mortalidade. (Tabela 6).

Tabela 6 – Mortalidade acumulativa dos diferentes tratamentos desafiados via ingestão do material infeccioso.

Tratamentos	Nº. de animais	Mortalidade acumulativa (%)							
		1º Dia	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia	18º Dia	21ºDia
INGESTÃO									
Controle	16	0	6,3	18,8	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Comercial	16	0	0	12,5	37,5	50,0	50,0	50,0	50,0
122	16	0	0	12,5	31,3	50,0	56,3	56,3	56,3
240	16	0	0	12,5	31,3	43,8	43,8	43,8	43,8
122+240	16	0	0	6,3	12,5	25,0	25,0	25,0	25,0

Pós-desafio bacteriano, a contagem total de hemócitos no tratamento 122+240 obteve uma das menores concentrações de células/ml em ambas as vias de infecção testadas. Para a contagem diferencial de hemócitos o perfil de concentração dos diferentes tipos de células foi diferente em cada via de infecção avaliada, onde os animais desafiados com a via injeção obtiveram um maior número de células semi-granulares sem distinção entre os tratamentos, e para a via de infecção ingestão, os tratamentos 122+240 e 240 obtiveram uma maior concentração de células hialinas. Esses resultados refletem na mortalidade encontrada para cada tratamento onde essas cepas (122+240 e 240) demonstraram a menor mortalidade, indicando que a suplementação com a cepa 122+240 apresenta um melhor desempenho imunoprolático em dos juvenis de *M. rosenbergii* infectados com o *V. parahaemolyticus*.

5. Cronograma de execução

Período	Ano (2018)					Ano (2019)						
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Treinamento em técnicas de rotina laboratorial (preparo de soluções, esterilização de material, etc)	X	X										
Aquisição de material de consumo e instalação das unidades experimentais	X	X										
Condução do experimento (oferta das dietas experimentais)				X	X	X	X					
Desafio bacteriano							X	X				
Análises laboratoriais				X	X	X	X	X	X	X		
Análise dos dados				X	X	X	X	X	X	X	X	X
Redação e apresentação dos relatórios parcial e final								X				X

6. Considerações finais

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a suplementação com as cepas probióticas 122, 240 e comercial, não acarreta diferença significativa na contagem total e diferencial de hemócitos em juvenis de *M. rosenbergii* antes do desafio bacteriano.

Pós-desafio bacteriano, diferenças na contagem total e diferencial de hemócitos em ambas as vias testadas serviram para constatar a superioridade da suplementação com a cepa 122+240 no desempenho imunoprolifático dos juvenis de *M. rosenbergii* infectados com o *V. parahaemolyticus*.

7. Referências bibliográficas

APINES-AMAR, Mary Jane S.; AMAR, Edgar C. 3. Use of immunostimulants in shrimp culture: An update. Research Signpost, 2015.

BALLESTER, Eduardo Luis Cupertino; MARZAROTTO, Shayene Agatha; SILVA DE CASTRO, Cecília; *et al.* Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. Aquaculture Research, 2017.

CELI, Monica; FILICIOTTO, Francesco; PARRINELLO, Daniela; *et al.* Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. Journal of Experimental Biology, 2013.

CHENG, Winton; CHEN, Jiann Chu. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunology, 2001.

CHENG, Winton; CHEN, Jiann Chu. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunology, 2000.

CHENG, W.; WANG, C. H. The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* and its resistance under copper sulfate stress. Diseases of Aquatic Organisms, 2001.

DASH, Gyanaranjan; RAMAN, Ram Prakash; PANI PRASAD, K.; *et al.* Evaluation of paraprobiotic applicability of *Lactobacillus plantarum* in improving the immune response and disease protection in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). Fish and Shellfish Immunology, 2015.

DEBNATH, P. P., KARIM, E., HAQUE, M. A., UDDIN, M., & KARIM, M. Prevalence of White Spot Syndrome Virus in Brood stock, Nauplii and Postlarvae of Tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798). Journal of Advanced Scientific Research, 2012

FAO, Fishery information: Data and Statistics Service. Aquaculture Production Statistics. FAO Fisheries Circular, 2018.

KUMAR, Vikash; ROY, Suvra; MEENA, Dharmendra Kumar; *et al.* Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 2016.

GOARANT, Cyrille; BOGLIO, Eric. Changes in hemocyte counts in *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2000.

HOSE, J. E.; MARTIN, G. G.; GERARD, A. S. A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function. *The Biological Bulletin*, 1990.

LEE, Y. K.; SOH, B. S.; WU, J. H. Quantitative assessment of phagocytic activity of hemocytes in the prawn, *Penaeus merguensis*, by flow cytometric analysis. *Cytometry*, 2001.

MARQUES, H.L.A. e MORAES-VALENTI, P.M.C., Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) and the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) in Brazil. *Aquac. Res.* 43: 984–992, 2012.

MATHIPA, Moloko Gloria; THANTSHA, Mapitsi Silvester. Probiotic engineering: Towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathogens*, 2017.

NEGRINI, Celma; DE CASTRO, Cecília Silva; BITTENCOURT-GUIMARÃES, Ana Tereza; *et al.* Stocking density for freshwater prawn *macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, palaemonidae) in biofloc system. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2017.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. *J. R. Stat. Soc.*, A135, p.370– 384, 1972.

NEW, Michael B.; NAIR, C. Mohanakumaran. Global scale of freshwater prawn farming. *Aquaculture Research*, 2012.

NEW, Michael Bernard; KUTTY, Methil Narayanan. Commercial Freshwater Prawn Farming and Enhancement Around the World. *In: Freshwater Prawns: Biology and Farming*. [s.l.: s.n.], 2010.

OTT, R.L. *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 4th ed. Wadsworth, Belmont, CA, USA., 1993.

PARRINELLO, D.; SANFRATELLO, M. A.; CELI, M.; *et al.* Hemocyte types and some plasmatic properties of two edible crabs *Cancer borealis* and *Cancer pagurus*. *Invertebrate Survival Journal*, 2015.

RANJIT KUMAR, N.; RAMAN, Ram Prakash; JADHAO, Sanjay B.; *et al.* Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture International*, 2013.

ROWLEY, A. F. The immune system of Crustaceans. In M. J. H. Ratcliffe (Ed.), *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 437–453, 1st edn). The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, UK: Academic Press (an imprint of Elsevier), 2016.

SANTOS, D. B. Comportamento e desempenho do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) em cultivos misto e monossexo. 141f. Tese (Doutorado em Psicobiologia)–Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências da UFRN. Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

SUWANSA-ARD, Saowaros; THONGBUAKAEW, Tipsuda; WANG, Tianfang; *et al.* In silico neuropeptidome of female *Macrobrachium rosenbergii* based on transcriptome and peptide mining of eyestalk, central nervous system and ovary. *PLoS ONE*, 2015.

SUMON, Mohammad Saifuddin; AHMMED, Fatema; KHUSHI, Sharmin Sultana; *et al.* Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. *Journal of King Saud University - Science*, 2018.

SIERRA, Claudia; GUEVARA, Jorge; LASCURAIN, Ricardo; *et al.* Sialylation is modulated through maturation in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 2001.

VALENTI, Wagner C.; NEW, Michael Bernard. Grow-out Systems - Monoculture. *In: Freshwater Prawn Culture: The Farming of Macrobrachium Rosenbergii*. [s.l.: s.n.], 2009.

WALKER, Peter J.; WINTON, James R. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research*, 2010.

8. Dificuldades encontradas

Devido às constantes quedas de energia, houve perda de material (animais), fazendo-se necessária a aquisição, por três vezes, de novos exemplares, que por conseguinte, culminaram com a repetição do presente estudo em três momentos, causando atraso no cronograma das atividades.

9. Parecer do orientador

Embora tenham ocorrido constantes faltas de energia que culminaram com a necessidade de repetição do experimento em três momentos, a discente Gisely Karla de Almeida Costa mostrou-se absolutamente dedicada a resolução destes problemas, com proatividade, participação produtiva, interesse, responsabilidade e assiduidade, com desempenho louvável em suas atividades.

Isto posto, recomendo enormemente sua continuidade neste programa.

Recife, 04 de julho de 2019.

