

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

**Potencialidade do uso de bactérias secretoras de
enzimas digestivas no cultivo do tambaqui *Colossoma
macropomum* (Cuvier, 1818)**

Michel Lopes Machado

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – PPG-BTRN/INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus – AM

2006

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

**Potencialidade do uso de bactérias secretoras de
enzimas digestivas no cultivo do tambaqui *Colossoma
macropomum* (Cuvier, 1818)**

Michel Lopes Machado

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – PPG-BTRN/INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

ORIENTADOR: Doutor Manoel Pereira Filho

CO-ORIENTADOR: Prof. Doutor Takeshi Matsuura

APOIO FINANCEIRO: FAPEAM e CNPQ

Manaus – AM

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Machado, Michel Lopes

Potencialidade do uso de bactérias secretoras de enzimas digestivas no cultivo do tambaqui

Colossoma macropomum (Cuvier, 1818). Michel Lopes Machado – 2005.

74 f.

Dissertação (Mestrado) – INPA/UFAM, Manaus, 2006

1. Tambaqui; 2. Nutrição de peixes; 3. Bactérias; 4. Enzimas digestivas; 5. Probióticos.

Key words: 1. Tambaqui; 2. Fish nutrition; 3. Bacteria; 4. Digestive enzymes; 5. Probiotic.

Sinopse:

Nesse estudo foi analisada quantitativamente a microbiota gastrintestinal do tambaqui *Colossoma macropomum* quanto à capacidade de produzir e secretar as enzimas digestivas amilase, lipase e protease. As bactérias secretoras de protease foram analisadas qualitativamente, as maiores secretoras foram avaliadas quanto à patogenicidade e submetidas à um processo de incorporação na em rações experimentais.

Palavras-chave: tambaqui, nutrição, bactérias, enzimas digestivas, probióticos.

Key words: tambaqui, nutrition, bacteria, digestive enzymes, probiotic.

DEDICATÓRIA

A minha mãe,

Lucélia

Ao meu pai,

Machado

A minha namorada

Patrícia

AGRADECIMENTOS

Aos Doutores. Manoel Pereira Filho pela orientação e Takeshi Matsuura pela co-orientação; atenção, amizade, paciência e ensinamentos prestados ao longo desta jornada.

Aos docentes do BADPI pela grande contribuição em minha formação.

Ao Doutor Rodrigo Roubach e MSc. Eduardo A. Ono pelas sugestões, apoio e idéias prestados no decorrer do trabalho.

Aos Prof.s MSc. Januário Gama dos Santos e MSc. Raimundo Felipe da Cruz Filho pelos ensinamentos, companheirismo e amizade durante todo o período que passei no laboratório de Microbiologia da UFAM.

Ao Doutor Bruno Adan Sagratzki pela ajuda durante todo o desenvolvimento deste estudo, desde a concepção da idéia do plano de trabalho à finalização dos experimentos.

À Doutora Maria Francisca Simas Teixeira pela ajuda, carinho, sugestões e disponibilização de seu laboratório para realizar algumas análises deste estudo.

À Doutora Ângela Varella, pela imensa dedicação que dispensa ao Curso de Mestrado e a todos os alunos e, pela ajuda especial prestada para a conclusão deste trabalho.

Às secretárias do curso Carminha Arruda e Elany Moreira, pelo ótimo trabalho, paciência e amizade.

A todos os funcionários da CPAQ pela amizade e ajuda prestada na execução dos experimentos.

Aos novos colegas de trabalho, Maria Nilda Leite e Mirian Leal Carvalho por prestarem todo o apoio necessário à conclusão deste trabalho.

Aos alunos e bolsistas do CPAQ: Renato Carlos, Emerson Soares, Flavio Augusto, André Bordinhon, Christian Castro, Daniel Ituassú, Michelle Façanha, Marcelo Fabrizio, Geraldo Pereira, Eduardo Braga, Helenice, Jackeline e César pela amizade e todos os momentos compartilhados.

Aos amigos da turma BADPI 2004, Cylene, Daniel, Dani boto, Dani tucuxi, Fábio, Fabiola, Gelson, Janaina, Léo, Luiza, Maria Claudia, Marcelo, Márcio, Marcos, Renildo e Rodrigo.

Aos amigos Lian e Verúcia, pela amizade e por terem me auxiliado tantas vezes.

Aos amigos da minha primeira casa em Manaus, os “alagados”, pela receptividade, amizade e pela luta para enfrentar todas as dificuldades que surgiram.

Aos amigos da minha segunda casa, Sinomar Júnior, Emiliano e Rondon, por toda a amizade e pelos bons momentos vividos nesta fase da minha vida.

Aos meus irmãos Marcel e Angélica e primo irmão Diego, e meus tios e tias, pela atenção, força e torcida para que tudo desse certo.

À Patrícia, pelo amor, compreensão e paciência que teve comigo durante todo esse tempo.

Aos meus pais, Machado e Lucélia, por permitirem que tudo isso fosse possível. Vocês são meu maior exemplo na vida, e apesar da distância me deram toda a confiança e segurança para vencer mais esta etapa do caminho.

Ao CNPq e a FAPEAM pela bolsa concedida e financiamento do projeto.

AM	Amazonas
cm	Centímetro
g	Gramma
°C	Graus Celsius
ha	Hectare
h	Horas
L	Litro
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
p/v	Peso por volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
kg	Quilograma
Km	Quilômetro
rpm	Rotações por minuto
U	Unidades
UA	Unidades de atividade
UFC	Unidades formadoras de colônias
Vit	Vitamina

Lista de figuras

Quadro 1: Produção aquícola nacional dos anos de 1998-2004.....	3
Figura 1: Exemplar de tambaqui utilizado no experimento.....	9
Figura 2: Rações experimentais na estufa de secagem.....	15
Figura 3: Avaliação da atividade proteolítica (1), amilolítica (2) e lipolítica (3) das bactérias isoladas do trato gastrintestinal de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	19
Figura 4: Tambaqui com bacteriose.....	21

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição centesimal da ração.....	14
Tabela 2: Contagem de células produtoras e secretoras de enzimas digestivas.....	17
Tabela 3: Características morfo-tintoriais das bactérias e respectivas atividades enzimáticas, expressas em unidades da enzima/mililitro (U/mL).....	19
Tabela 4: Principais resultados da identificação por características fenotípicas das linhagens com atividade proteolítica mais promissoras.....	21
Tabela 5: Contagem de células viáveis antes e após o processo de fabricação da ração.....	22

Resumo

A piscicultura é uma atividade na área da produção animal que apresentou altas taxas de crescimento no estado do Amazonas nos últimos anos, sendo o tambaqui a espécie mais cultivada. As despesas com alimentação podem ser responsáveis por até 60% do custo de produção. Uma área de pesquisa que está crescendo em aquíicultura é o desenvolvimento e uso de probióticos, microrganismos vivos que habitam o trato gastrintestinal que podem conferir alguma vantagem para o hospedeiro. Estudos com tambaqui indicam que a inclusão de enzimas exógenas na ração aumenta a digestibilidade dos nutrientes. Neste trabalho foi realizado um *screening* de bactérias secretoras de enzimas digestivas no trato gastrintestinal do tambaqui, e os isolados secretores de protease mais promissores foram submetidos a um processo de inclusão na ração experimental. As atividades testadas foram amilolítica, lipolítica e proteolítica. A contagem de colônias produtoras das enzimas foi de $1,31 \times 10^8$, $1,82 \times 10^8$ e $1,27 \times 10^8$ UFC/g de tecido, respectivamente, com quatro, 29 e 46 isolados secretores. Dentre os 46 isolados secretores de protease, seis apresentaram atividade maior do que duas unidades de atividade (UA), oito apresentaram atividade entre uma e duas UA e 32 tiveram atividade menor que uma UA. As linhagens TP1, TP20 e T3P18 passaram por teste de patogenicidade *in vivo*, não causaram mortalidade e foram adicionadas à ração. Culturas puras dos isolados foram caracterizadas morfológica e bioquimicamente e, de acordo com os testes, foram identificadas como *Micrococcus* sp. e *Bacillus* sp. Houve uma perda da ordem de duas potências no número de células viáveis durante o processo de fabricação em todas as rações experimentais. O tambaqui conta com uma fonte microbiana (portanto exógena) de enzimas (amilase, lipase e protease), além das fontes endógenas presentes no seu trato gastrintestinal, que podem auxiliar no processo digestivo. A incorporação dos microrganismos à ração mostrou-se viável.

Abstract

Aquaculture in Amazonas state is increasing at a very high ratio in the last few years, and the tambaqui is the main cultured specie. Feeding may represent up to 60% of the final producing costs. A research area increasing rapidly in aquaculture is on the development and use of probiotics, microorganisms living in the gastrintestinal tract that may have benneficial effects to the host. Isolation and enumeration of bacterial microbiota have been carried out, and the best protease extracellular producers were tested to be incorporated in fish diets. Amylolytic, lipolytic and proteolytic activities have been screened, and viable count of the enzyme producing were $1,31 \times 10^8$, $1,82 \times 10^8$ and $1,27 \times 10^8$ UFC/g digestive tract, respectively, with four, 29 and 46 extracellular producers. Within the 46 extracellular protease producers, six of them have exhibited higher activity than two UA, 32 have exhibited activity between one and two UA and eight had activity lower than one UA. Isolates TP1, TP20 e T3P18 have been considered not pathogen, and the incorporation process to diet has been evaluated. Pure cultures of these strains have been selected for morphological and biochemical characterization. On the basis of these tests, the isolate TP1 was identified as *Micrococcus* sp. and the others to genus *Bacillus* sp. We observed a decaying of 10^2 viable counts in the experimental diet tested during the process. There is a distinct microbial source of digestive enzymes (amylase, lipase and protease) apart from the endogenous sources in tambaqui gastrointestinal tract. The extracellular protease producing bacteria kept viable after incorporation process.

Sumário

I – INTRODUÇÃO.....	1
I.1 - Amazônia.....	1
I.2 - Tabaqui.....	2
I.3 - Piscicultura.....	2
I.4 - Nutrição.....	3
I.4.1 - Nutrição do tabaqui.....	4
I.5 - Bactérias em peixes.....	5
I.6 - Probióticos.....	6
II - OBJETIVOS.....	8
II.1 - Objetivo Geral.....	8
II.2 - Objetivos Específicos.....	8
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	9
III.1 - Amostra.....	9
III.2 – Processamento da amostra.....	10
III.3 - Isolamento das bactérias produtoras de enzimas digestivas em peixes.....	10
III.3.1 - Avaliação das bactérias produtoras de enzimas.....	11
III.4 - Preservação dos isolados.....	12
III.5 - Ensaio quantitativo de produção de enzima proteolítica.....	12
III.5.1 - Preparação do extrato microbiano.....	12
III.5.2 - Determinação da atividade.....	12
III .6 Identificação preliminar das bactérias com atividade proteolítica promissoras.....	13
III.7 - Avaliação da patogenicidade dos isolados <i>in vivo</i>	13
III.8 - Preparo e verificação da viabilidade dos microrganismos na ração.....	14
III.9 - Avaliação da viabilidade das bactérias adicionadas à ração.....	16
IV – RESULTADOS.....	17
IV.1 - Isolamento de bactérias produtoras de enzimas digestivas no tabaqui.....	17

IV.2 - Ensaio quantitativo da produção de enzima proteolítica.....	19
IV.3 - Avaliação <i>in vivo</i> da patogenicidade.....	20
IV.4 - Identificação preliminar das bactérias com atividade proteolítica promissoras.....	21
IV.5 - Avaliação da viabilidade das bactérias adicionadas à ração.....	22
V – DISCUSSÃO.....	23
VI - CONCLUSÕES.....	30
VII - REFERÊNCIAS.....	31

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Amazônia

A Amazônia dispõe de vários fatores que favorecem a piscicultura, tais como: solos, águas em abundância com qualidade, diversidade da fauna ictiológica e, principalmente, na região de Manaus, mercado consumidor.

O Estado do Amazonas, neste contexto, destaca-se dentre os outros estados do Brasil, por possuir características favoráveis à piscicultura, além de ter disponibilidade de espaço físico e de água doce em abundância (Val & Honczaryk, 1995). O desenvolvimento da aquicultura na Amazônia, sobretudo na sua porção ocidental, teve seu início por volta de 1980 com a implantação do Programa de Desenvolvimento da Piscicultura pelo governo do Amazonas, que resultou na compra, já no ano seguinte, de alevinos de tambaqui oriundos do nordeste do Brasil. Posteriormente, em 1991, entrou em funcionamento a Estação de Piscicultura de Balbina (Presidente Figueiredo, AM) que, sob a administração da extinta EMATER/AM, iniciou a produção e distribuição de juvenis aos piscicultores de toda a Amazônia, além da prestação de serviços e assistência técnica para a criação em barragens.

Atualmente, numa terceira fase, sistemas mais intensivos de produção estão sendo empregados, a exemplo do tanque-rede e da criação em cercados no leito de canais de igarapés, sistema este que segue os mesmos princípios da criação em *raceways*. As espécies mais cultivadas são: o tambaqui, o matrinxã e, mais recentemente, o pirarucu (Ono, 2005). Dados oficiais do IBAMA para o ano de 2004 mostram uma produção de 4.775 toneladas de pescado pela aquicultura no estado do Amazonas, sendo duas espécies responsáveis por mais de 99% deste volume: tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a matrinxã (*Brycon amazonicus*).

I.2 - Tambaqui

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe da família Serrasalmidæ, de crescimento rápido, presente nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco. O hábito alimentar dos tambaquis juvenis é basicamente composto por plâncton, enquanto que dos adultos é amplo e predominantemente herbívoro, constituindo-se de frutos e sementes. Alguns autores, como Saint-Paul (1991) consideram os adultos exclusivamente frugívoros. Goulding (1993) identificou 112 espécies de frutos e sementes como alimento do tambaqui, enquanto que Silva *et al.* (2003) observaram que a alimentação do tambaqui engloba pelo menos 133 espécies entre frutos e sementes. Em contrapartida, Silva e colaboradores (2000) demonstraram que durante a seca, a dieta constitui-se basicamente de zooplâncton, e a fração protéica do conteúdo estomacal foi de cerca de 45-57%, em matéria seca.

A espécie tem alto valor comercial e é bastante apreciada pelo consumidor local, sendo que já atingiu até 44% do peso total desembarcado no mercado municipal de Manaus em 1976 (Val & Honczaryk, 1995). Porém, atualmente, os estoques naturais apresentam-se sobre explorados. As técnicas de reprodução artificial já foram bem estabelecidas, assim como a adaptação com sucesso para o cultivo em cativeiro.

Todas essas características favoreceram para que o tambaqui fosse o peixe mais cultivado no Estado do Amazonas em 2004 (IBAMA, 2005) com 4.518,5 toneladas representando cerca de 95% da produção aquícola neste ano.

I.3 - Piscicultura

A piscicultura é a atividade dentro da área de produção animal que mais cresce no Brasil e no mundo. A produção mundial de pescados pela aquíicultura passou de 10

milhões de toneladas em 1988 para 29 milhões de toneladas em um intervalo de dez anos (FAO, 1999).

No Brasil, o IBAMA é o órgão responsável pela estatística da produção de pescados, tanto pela pesca extrativa quanto pela aquicultura. O quadro abaixo mostra a produção de pescado pela aquicultura no Brasil no período entre 1998 e 2004. Verifica-se no período um crescimento de 204% na produção da aquicultura continental, 579% na aquicultura marinha e 259% na produção total.

Quadro 1: Produção aquícola nacional dos anos de 1998-2004.

ANO	AQÜICULTURA		TOTAL (ton)
	Marinha	Continental	
1998	15.349,0	88.565,5	103.914,5
1999	26.513,5	114.142,5	140.656,0
2000	38.374,5	138.156,0	176.530,5
2001	52.846,5	156.532,0	209.378,5
2002	71.114,0	180.173,0	251.287,0
2003	101.003,0	177.125,5	278.128,5
2004	88.967,0	180.730,5	269.697,5
Aumento	204%	579%	259%

(Fonte: IBAMA, 2005)

I.4 - Nutrição

A alimentação na piscicultura é o fator mais oneroso no desenvolvimento da atividade, representando até 60% do custo de produção, sendo a proteína bruta o componente mais caro das rações de peixes, e pode representar de 30 a 50% da composição (Kubitza, 1998; Hardy, 1999; Cheng *et al.*, 2003).

O suprimento limitado e o alto custo deste ingrediente têm estimulado a pesquisa sobre fontes alternativas de proteínas provenientes de ingredientes vegetais, que se apresentam como opções mais viáveis para a piscicultura. Existem, entretanto, fatores limitantes: altos níveis de amido estão presentes nestes ingredientes e torna-se necessário o monitoramento da capacidade do fígado desses peixes de metabolizar e/ou armazenar carboidratos (Legate *et al.*, 2001); a presença de fatores antinutricionais, geralmente, as proteínas de fontes vegetais são deficientes em alguns aminoácidos essenciais (Dersjant-Li, 2002).

Dentre os vários suplementos protéicos vegetais usados na aquicultura, a soja tem sido mais extensivamente avaliada e mais comumente usada em rações comerciais. Sua aceitabilidade e utilização pela indústria de ração dependem do avanço das pesquisas nutricionais para as espécies cultivadas (Akiyama, 1998). O farelo de soja possui um perfil de aminoácidos essenciais bem balanceados (Lim & Akiyama, 1992), porém os aminoácidos sulfurados, metionina e cistina, são considerados limitantes nos produtos de soja em vista do requerimento da maioria das espécies de peixes (NRC, 1993). Além disso, a soja é naturalmente resistente à oxidação e deterioração, e livre de organismos como fungos, vírus e bactérias que podem ser tóxicos para os peixes (Swick *et al.*, 1995).

I.4.1 - Nutrição do tambaqui

Vásquez (2001) demonstrou a presença simultânea das enzimas maltase, amilase, lipase e protease no trato gastrintestinal de tambaqui e afirmou que a habilidade desta espécie para utilizar, de forma eficiente, uma ampla variedade de nutrientes disponíveis na sua dieta no ambiente é devida à ação destas enzimas.

Estudos realizados com tambaqui demonstraram a possibilidade de substituição total de alimentos de origem animal, principalmente a farinha de peixe, por ingredientes de origem vegetal como o farelo de soja, sem grandes prejuízos ao desempenho do peixe (Van der Meer *et al.*, 1996, 1997).

I.5 – Bactérias em peixes

Nos peixes, o estabelecimento da microbiota bacteriana se inicia antes do estágio de alimentação exógena. Goodrich & Morita (1977) e Hansen & Olafsen (1999) observaram a existência de uma microbiota bacteriana em larvas com saco vitelínico de halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) e bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), respectivamente, antes mesmo do início da alimentação exógena. Segundo os trabalhos de Mangor-Jensen & Adoff (1987), Tyler & Blaxter (1988) e Reitan *et al.* (1998), as larvas de peixes marinhos ingerem água para atingir o equilíbrio osmorregulatório, ocorrendo, concomitantemente, a ingestão de bactérias da coluna d'água.

No início da fase larval existem poucas bactérias no trato gastrointestinal. A adesão à mucosa é o primeiro passo no processo de colonização, desta forma, se bactérias específicas ocuparem os sítios de adesão do trato gastrointestinal antes que bactérias oportunistas apareçam no ambiente de cultivo, o peixe pode obter defesas contra doenças bacterianas antes da completa formação de seu sistema imune. Sugita *et al.* (1982) mostraram que a microbiota do trato gastrointestinal de tilápia (*Tilapia mossambica*) se estabelece entre 20 e 60 dias após o início da alimentação.

Entretanto, a interação entre os peixes cultivados e as bactérias da água do cultivo se inicia antes mesmo da ingestão do saco vitelínico. As bactérias colonizam a superfície dos ovos fertilizados, especialmente sob condições intensivas de cultivo, e tal colonização pode ter efeitos negativos para os ovos e embriões em desenvolvimento

(Bergh *et al.*, 1992; Hansen *et al.*, 1992). Práticas como o uso de antibióticos, tratamento da água ou desinfecção podem inibir a proliferação de bactérias oportunistas, porém, estas medidas podem afetar o balanço das comunidades microbianas e resultar em condições desfavoráveis ao cultivo, não sendo, portanto, recomendadas (Olafsen, 2001).

De acordo com Syvokien & MickJnien (1998), a quantidade de células viáveis na água é várias vezes menor que aquela observada no sistema digestório dos peixes, indicando que dentro do estômago e intestino os microrganismos encontram um ambiente favorável para seu desenvolvimento. Peixes com uma microbiota abundante têm vantajosas oportunidades de adaptar-se a mudanças nutricionais e assimilar melhor os nutrientes, aumentando assim sua vantagem adaptativa.

I.6 - Probióticos

Uma área de pesquisa bem consolidada para animais terrestres e que vem crescendo de forma substancial na aquicultura é o uso de probióticos. Segundo Gatesoupe (1999), probióticos são microrganismos administrados para aderir ao trato gastrintestinal do indivíduo e conferir alguma vantagem a sua saúde. Vanbelle e colaboradores (1990) consideram ainda a produção de compostos benéficos, por microrganismos, a seu hospedeiro, tais como vitaminas e enzimas digestivas.

Vários benefícios foram atribuídos ao uso de probióticos na aquicultura. Algumas bactérias do gênero *Vibrio* aumentaram a resistência de peixes contra patógenos comuns em ensaios *in vivo* (Westerdahl *et al.*, 1991; Olsson *et al.*, 1992; Bergh *et al.*, 1997; Hansen & Olafsen, 1999; Sugita *et al.*, 1996), enquanto que Vine *et al.* (2004) observaram inibição contra microrganismos patógenos em ensaios *in vitro*. O trabalho de Lara-Flores e colaboradores (2003) mostrou que a suplementação de

Streptococcus faecium e *Lactobacillus acidophilus* na ração melhora o crescimento de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Grande parte do fósforo presente na soja está na forma de ácido fítico, sendo que a maioria dos peixes não consegue aproveitá-lo. Entretanto, vários estudos relatam um aumento na disponibilidade de fósforo em rações com ingredientes vegetais devido à quebra do ácido fítico (Schafer *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1996; Eya & Lovell, 1997). Sugita *et al.* (1991) identificaram bactérias produtoras de vitamina B12 no trato gastrintestinal de peixes de água doce.

Goodrich & Morita (1977) identificaram bactérias secretoras de quitinase em peixes marinhos e Bairagi *et al.* (2002) identificaram bactérias secretoras de enzimas digestivas (amilase, celulase, protease e lipase) no trato gastrintestinal de dez espécies de peixes de água doce cultivados. Estes autores sugeriram ainda que a diversidade de microrganismos do trato gastrintestinal é maior em peixes herbívoros, e que o tipo de enzima digestiva produzida por essa microbiota reflete o hábito alimentar da espécie.

Vários estudos têm sido conduzidos com a introdução de bactérias selecionadas na água de cultivo, favorecendo o desenvolvimento de uma microbiota especial no sistema digestivo das larvas de bacalhau e turbot (Strom & Ringø, 1993; Ringø *et al.*, 1996; Gildberg *et al.*, 1997; Gildberg & Mikkelsen, 1998; Ringø & Vadstein, 1998; Huys *et al.*, 2001), e também com o microrganismo sendo suplementado na ração (Gildberg *et al.*, 1997; Vine *et al.*, 2004).

O mecanismo através do qual o probiótico possa trazer algum benefício ao hospedeiro ainda não estão completamente elucidados, acredita-se que enzimas produzidas por microrganismos podem aumentar a digestibilidade dos ingredientes presentes na ração de cultivo ou ainda atuar na degradação de fatores antinutricionais.

II - OBJETIVOS

II.1 – Geral

Determinar a viabilidade de aproveitamento de enzimas digestivas produzidas pela microbiota bacteriana do trato gastrointestinal do tambaqui (*Colossoma macropomum*) em rações para a piscicultura.

II.2 - Específicos

- a) Isolar bactérias secretoras de proteases, lipases e amilases do trato gastrointestinal de tambaqui;
- b) Determinar quantitativamente a atividade proteolítica dos isolados;
- c) Testar a patogenicidade dos isolados promissores frente ao tambaqui;
- d) Verificar a viabilidade da incorporação dos microrganismos à ração.

III - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e na Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

III.1 - Amostra

Os tambaquis, *Colossoma macropomum*, cultivados de forma semi-intensiva, foram obtidos no pesque e pague San Diego Manaus, situado no Km 35 da Rodovia AM-010, no município de Manaus, AM. Os peixes foram coletados em um açude de seis ha abastecido por água da chuva, com as seguintes características físico-químicas no dia da coleta: oxigênio dissolvido (mg/L), 7,3; temperatura (°C), 29,7; pH, 6,7. O açude era povoado por uma quantidade desconhecida de tambaqui e matrinxã (*Brycon amazonicus*) destinados à pesca esportiva. Foram capturados quatro indivíduos com peso médio de 850g.



Figura 1: Exemplar de tambaqui utilizado no experimento.

III.2 - Processamento da amostra

Os peixes foram transportados, individualmente, em sacos plásticos limpos, até as instalações da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e mantidos em tanques circulares de 300 L com aeração e troca de água constante. Permaneceram por um período de jejum de 48h antes do sacrifício, foram colocados em caixas isotérmicas resfriadas e levados ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) para o devido processamento.

Os animais foram sacrificados em banho de gelo e após o sacrifício, cada indivíduo foi mergulhado em solução de iodo a 1% por dois minutos para esterilização da superfície externa dos peixes (Trust & Sparrow, 1974) e lavada com solução salina estéril a 0,85%. Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta com lâmina de bisturi estéril e o trato gastrintestinal retirado. O intestino foi triturado, e retirou-se 10g do homogeneizado, suspendeu-se em 90 mL de solução salina estéril.

III.3 - Isolamento das bactérias produtoras de enzimas digestivas em peixes

A suspensão acima citada foi diluída em série, sendo que 0,1 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas na superfície de placas de Petri, em triplicata, nos meios Ágar Amido, Ágar Leite, Ágar Tween 80 e incubadas a temperatura de 27 °C por um período de até 48h (Beveridge *et al.*, 1991; Das & Tripathi, 1991). Colônias bem isoladas e macroscopicamente diferentes foram re-isoladas e semeadas novamente na superfície das placas de Petri contendo o meio Ágar Nutriente para obtenção de culturas puras através da técnica de estrias por esgotamento.

III.3.1 - Avaliação das bactérias produtoras de enzimas

Revelou-se as linhagens produtoras de enzimas amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas, crescidas nas placas apropriadas para esta verificação, conforme se segue:

a) Enzimas amilolíticas

O meio de caracterização da atividade amilolítica foi o Ágar Amido (Smibert & Krieg, 1994). A detecção da atividade enzimática foi feita através da exposição das placas ao vapor de iodo. O iodo cora o amido de azul, e bactérias secretoras de amilases apresentam um halo claro, transparente, ao redor da colônia, onde o amido foi degradado.

b) Enzimas lipolíticas

O meio de caracterização da atividade lipolítica foi o Ágar Tween 80 (Smibert & Krieg, 1994). A formação de enzima lipolítica pela colônia pode ser vista como um precipitado visível devido à formação de cristais de sais de cálcio de ácido láurico liberado pela enzima, ou como uma zona clara ao redor da colônia devido à degradação completa dos sais de ácidos graxos.

c) Enzimas proteolíticas

O meio de caracterização da atividade proteolítica foi o Ágar Leite, conforme Teixeira *et al.* (1996). O resultado positivo da produção da enzima é feito através da formação de um halo translúcido ao redor da colônia devido à degradação das proteínas do leite.

III.4 - Preservação dos isolados

Os isolados foram preservados em processo de criogenia a -20°C , conforme técnica preconizada por Muro e Luchi (1989) e encontram-se depositadas na Coleção de Culturas Bacterianas do Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas.

III.5 - Ensaio quantitativo de produção de enzima proteolítica

III.5.1 - Preparação do extrato microbiano

Os isolados que apresentaram atividade proteolítica foram submetidos a um ensaio quantitativo para dosagem da atividade enzimática. As culturas foram inoculadas em 10 mL de Caldo Nutriente e mantidos por 24h a temperatura de 27°C sob agitação de 150 rpm. Foram retiradas alíquotas de 0,1 ml deste pré-cultivo, inoculadas em 10 mL de Caldo Leite e mantidas por 24h a temperatura ambiente sob agitação de 150 rpm. A seguir foram centrifugadas a 7000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi usado para análise quantitativa da enzima.

III.5.2 - Determinação da atividade

O extrato das culturas foi submetido à análise enzimática quantitativa, utilizando-se como substrato a azocaseína a 1% (p/v) (Sigma, St. Louis, MOUSA) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, contendo de CaCl_2 0,1 mM (Smibert & Krieg, 1994).

A reação foi formulada com 250 μL do substrato (azocaseína 1%) e 250 μL do extrato enzimático. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C em tubos de ensaio tampados. A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Os tubos foram agitados em vortex e centrifugados por 15 minutos a 7000 rpm para total precipitação. Foi retirado 1,2 mL do sobrenadante e misturado com 1,4 mL de NaOH 1 M para leitura no espectrofotômetro. Todas as análises foram feitas

em duplicata e o branco foi preparado mantendo-se as mesmas condições da amostra, com meio de indução estéril substituindo o extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 1 unidade em 1 hora.

III.6 - Identificação das bactérias promissoras

As bactérias apresentando as maiores atividades proteolíticas foram identificadas através de provas bioquímicas e fisiológicas conforme Holt *et al.* (1994).

III.7 - Avaliação da patogenicidade dos isolados *in vivo*

Após a quantificação da atividade proteásica, os isolados foram ranqueados em ordem decrescente e as quatro linhagens que apresentaram as maiores atividades enzimáticas nas condições experimentais foram utilizados em um teste *in vivo* para avaliar sua patogenicidade sobre o tambaqui.

Foram montados quatro aquários com 20 L, aeração constante sem renovação de água. Juvenis de tambaqui com média de 50g, provenientes da CPAQ foram utilizados no ensaio. Cada aquário recebeu 10 peixes, e o período de aclimação foi de 48h. Em seguida os peixes foram colocados nos aquários contendo as bactérias na concentração final de 10^6 células/mL de água, e monitorados por 72 h para avaliação da mortalidade dos exemplares de tambaqui.

III.8 - Preparo e verificação da viabilidade dos microrganismos na

ração

Foram preparados 10 kg (peso total úmido) de ração A e ração B, contendo 22% e 28% de proteína bruta, respectivamente. A tabela 1 apresenta a composição das referidas rações.

Tabela 1. Composição centesimal da ração.

Ingredientes	Ração	
	A (%)	B (%)
Farelo de soja	22,30	38,00
Fubá de milho	47,40	34,20
Farelo de trigo	16,30	13,80
Farinha de peixe	10,00	10,00
Óleo de milho	3,00	3,00
Premix*	1,0	1,0

* Composição do premix vitamínico e mineral por kg: fósforo 0,5%; cobre 2,66mg; ferro 16,66mg; iodo 0,25mg; manganês 25mg; zinco 16,6mg; vit. A 3,33UI; vit. E 2UI; vit. C 1,000 ppm, vit. D3 800UI; vit B10,46mg; vit. B12 3,33mg; vit B2 1,66mg; vit K 0,52mg.

Metade do farelo de milho foi cozido antes da inclusão na ração. Os ingredientes foram misturados manualmente um a um até que a mistura obtivesse um aspecto uniforme, e em seguida foi adicionada água na proporção de 20% (p/v) para facilitar a formação dos pelets. Nas rações experimentais, a água foi substituída pela suspensão contendo os isolados. Após a incorporação dos isolados (ou água no controle), a ração foi peletizada e seca em estufa a 35°C por 36h (Figura 2).



Figura 2: Rações experimentais na estufa de secagem.

Foram escolhidos três níveis de inclusão dos isolados nas rações experimentais, além do controle. A cada ração experimental foi adicionada uma suspensão das bactérias contendo 10^4 (rações A1 e B1), 10^6 (A2 e B2) e 10^8 células/g de ração (A3 e B3), respectivamente, sendo que cada um dos isolados foi aprovado no teste de patogenicidade.

As três culturas foram crescidas em meio Ágar Müller-Hinton, incubadas a 27°C durante 24 h, e em seguida preparada uma suspensão de células de cada isolado com aproximadamente 10^{12} células/mL, determinadas de acordo com o padrão de turbidez da escala McFarland. Um volume de 1 mL de cada uma das três suspensões foi misturado para ser adicionado às rações experimentais A3 e B3. Essa suspensão foi diluída 10^{-2} e 10^{-4} vezes, respectivamente, para compor as rações A2 e B2, e A1 e B1.

Cada suspensão contendo a mistura dos isolados foi pulverizada sobre as rações e misturada de maneira a garantir uma distribuição homogênea.

Antes de serem utilizadas nas rações experimentais, foi determinada a viabilidade das suspensões, onde três alíquotas de 10 µL de cada diluição foram plaqueadas em Ágar Müeller-Hinton e incubadas a 27° C durante 24h.

III.9 - Verificação da viabilidade dos isolados na ração

Após a secagem da ração em estufa, verificou-se a viabilidade das bactérias contidas na mesma, através do processo de contagem de células viáveis. Esta etapa visa verificar a capacidade destas bactérias de crescer e multiplicar após o processo de preparo da ração. Alíquotas de cada ração experimental, inclusive de controles, foram retiradas ao fim do processo de secagem, acondicionadas em frascos estéreis e levadas ao laboratório para contagem de células viáveis (Koch, 1994).

Um grama de cada ração foi homogeneizado em 99mL de solução salina estéril, agitado por 30 minutos a 150 rpm, e submetido a diluições seriadas na ordem de 10^{-2} até a diluição final de 10^{-6} . Para cada ração experimental foi utilizada uma placa de Petri com meio Ágar Müeller-Hinton demarcada em quatro partes. Em cada quadrante foram dispostas três gotas de 10 µL das diluições.

IV - RESULTADOS

IV.1 - Isolamento de bactérias produtoras de enzimas digestivas no tambaqui

A tabela 2 mostra o número total de células produtoras e das secretoras de enzimas digestivas.

Tabela 2: Contagem de células produtoras e secretoras de enzimas digestivas

TAMBAQUI	MEIOS DE CULTURA						TOTAL
	AL		AA		AT80		Isolados bioativos
	UFC/g (x10 ⁸)	Isolados proteolíticos	UFC/g (x10 ⁸)	Isolados amilolíticos	UFC/g (x10 ⁸)	Isolados lipolíticos	
A	1,46	18	1,16	0	1,83	7	25
B	1,33	9	1,66	0	1,26	4	13
C	1,10	13	1,00	0	1,76	8	21
D	1,40	6	1,43	4	2,43	10	20
TOTAL	-	46	-	4	-	29	79
Média	1,32	-	1,31	-	1,82	-	

Legenda: AL: Agar Leite; AA: Agar Amido; AT80: Agar Tween 80

A contagem total de células da microbiota gastrointestinal de tambaqui variou da ordem de 1 a 2,43 x 10⁸ UFC/g de intestino de tambaqui com os meios utilizados (Tabela 2).

A tabela 2 ainda mostra que o tambaqui A apresentou o maior número de isolados secretoras de enzimas digestivas, com o total de 25 bactérias (31,6 %), enquanto que o tambaqui B apresentou o menor número com 13 isolados (16 %). As bactérias proteolíticas mostraram ser o grupo enzimático predominante com 46 isolados (58,2). Enquanto que quatro isolados (5,0 %) secretoras de amilase foram encontrados apenas no tambaqui D, e ainda foi o único a contar com os três grupos enzimáticos. A

figura 3 mostra a atividade proteolítica, amilolítica e lipolítica das bactérias isoladas do trato gastrintestinal dos tambaquis.

O maior crescimento médio observado foi no meio de detecção da atividade lipolítica, com $1,82 \times 10^8$ UFC/g de intestino do tambaqui, seguido da atividade amilolítica com $1,31 \times 10^8$ UFC/g e da atividade proteolítica com $1,27 \times 10^8$ UFC/g.

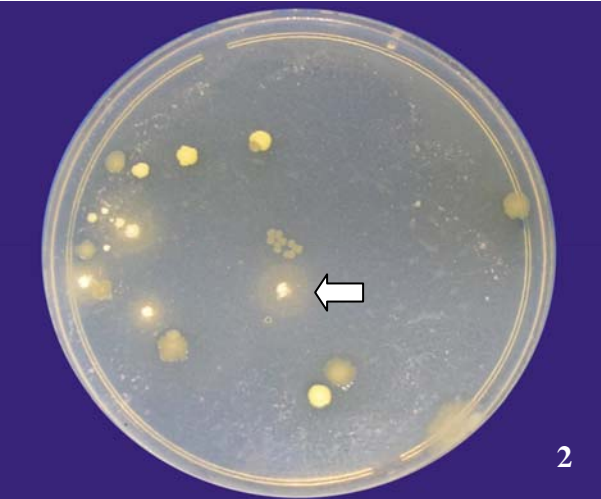
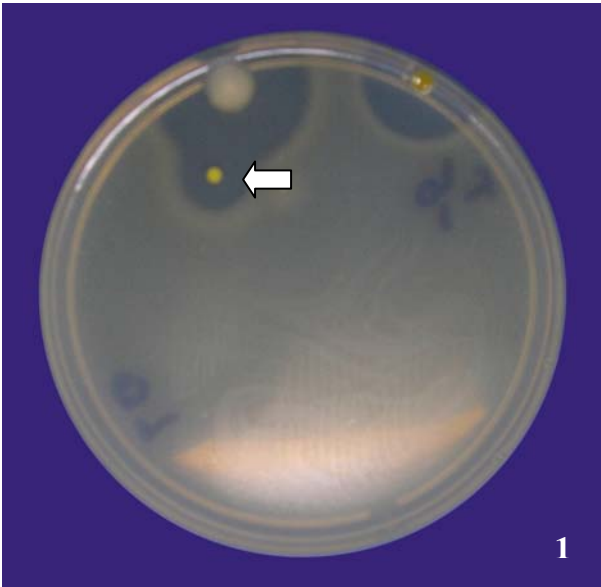


Figura 3: Avaliação da atividade proteolítica (1), lipolítica (2) e amilase (3) das bactérias isoladas do trato gastrointestinal de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

IV.2 - Ensaio quantitativo da produção de enzima proteolítica

A tabela 3 mostra a características morfológicas e tintoriais das bactérias isoladas no trato gastrointestinal de tambaqui.

Tabela 3: Características morfo-tintoriais das bactérias e respectivas atividades enzimáticas, expressas em unidades da enzima/mililitros (U/mL).

CÓDIGO	CARACTERÍSTICAS MORFO-TINTORIAIS	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (U/mL)
T2P4	Actinomiceto	0,256
TP10	Actinomiceto	0,352
T2P9	Actinomiceto	1,424
T2P16	Actinomiceto	0,128
T2P1	Bacilos Gram-negativo	0,116
T2P2	Bacilos Gram-negativo	0,184
T2P19	Bacilos Gram-negativo	0,156
T4P2	Bacilos Gram-negativo	0,16
T4P7	Bacilos Gram-negativo	0,16
TP5	Bacilos Gram-negativo	0,128
TP18	Bacilos Gram-negativo	1,784
TP2	Bacilos Gram-negativo	1,256
T2P17	Bacilos Gram-positivo	1,424
TP3	Bacilos Gram-positivo	0,12
TP9	Bacilos Gram-positivo	0,1
TP12	Bacilos Gram-positivo	0,12
TP15	Bacilos Gram-positivo	1,54
TP19	Bacilos Gram-positivo	1,948
TP20	Bacilos Gram-positivo	2,42
T3P9	Bacilos Gram-positivo	5,324
T3P11	Bacilos Gram-positivo	4,764
T3P18	Bacilos Gram-positivo	4,488
T2P10	Cocos Gram-positivo	0,16
TP4	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,144
TP6	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,108
T4P3	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,144
T4P4	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,396
T4P5	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,184
T4P6	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,156
T3P1	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,124
T3P2	Cocos-bacilo Gram-negativo	2,4
T3P3	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,14
T3P4	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,144
T3P5	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,168
T3P6	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,14
T3P7	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,112
T3P8	Cocos-bacilo Gram-negativo	0,14
TP8	Cocos Gram-negativo	0,14
TP1	Cocos Gram-positivo	2,504

TP7	Cocos Gram-positivo	0,16
TP14	Cocos Gram-positivo	1,08
TP17	Cocos Gram-positivo	0,964
TP21	Cocos Gram-positivo	0,904
T2P18	Cocos Gram-positivo	1,072
T3P15	Cocos Gram-positivo	0,148
T3P10	Cocos Gram-positivo	0,164

Dentre os 46 isolados secretores de protease, seis apresentaram atividade maior do que duas UA, oito apresentaram atividade entre uma e duas UA e 32 tiveram atividade menor que uma UA. O isolado T3P9 apresentou a maior atividade, de 5,32UA. O grupo dos bacilos gram positivos se destacou entre os isolados com maior atividade proteolítica. Entre os dez maiores produtores da enzima, sete pertenceram a esse grupo.

Verifica-se ainda que os coco-bacilos Gram-negativos foram os mais freqüentes secretores de protease, com 14 colônias; porém nenhuma delas teve atividade maior do que 0,5 UA/mL de extrato. Em seguida vieram os bacilos Gram-positivos com dez isolados.

IV.3 - Avaliação *in vivo* da patogenicidade

As linhagens TP1, TP20, T3P18 e T3P9 foram as maiores produtoras de enzimas proteolíticas e desta forma, foram escolhidas para o teste de patogenicidade *in vivo*. Verificou-se que não houve mortalidade dos peixes nos aquários em que foram inoculados os isolados TP1, TP20 e T3P18.

No aquário com o isolado T3P9 ocorreu a morte de um indivíduo após 24h do experimento (Figura 4). Na análise *pos mortem*, esta linhagem apresentou as escamas opacas, pequenas manchas brancas no corpo e região da cabeça e início de necrose nas nadadeiras e cauda, começado a partir das extremidades. Este isolado não foi utilizado para inclusão nas rações experimentais.



Figura 4: Tambaqui características típicas de doença bacteriana

IV.4 - Identificação preliminar das bactérias com atividade proteolítica promissoras

Os testes mais relevantes na identificação por características fenotípicas das linhagens mais promissoras com atividade proteolítica são observados na tabela 5.

Tabela 4. Principais resultados da identificação por características fenotípicas das linhagens com atividade proteolítica mais promissoras.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	LINHAGEM		
	TP1	TP20	T3P18
Forma	Cocos	Bacilos	Bacilos
Coloração de Gram	+	+	+
Arranjo	Tétrades	Estreptobacilos	Estreptobacilos
Esporo	-	+	+
Catalase	+	+	+
Relação com oxigênio	Anaeróbio facultativo	Anaeróbio facultativo	Anaeróbio facultativo

De acordo com os resultados da tabela 5, infere-se que a bactéria TP1 pertence ao gênero *Micrococcus* e as bactérias TP20 e T3P18 pertencem ao gênero *Bacillus*.

Estas linhagens estão depositadas na Coleção de Culturas Bacterianas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas.

IV.5 - Avaliação da viabilidade das bactérias adicionadas à ração

As linhagens TP1, TP20 e T3P18 foram testadas na ração. Foram misturadas previamente e incluídas na ração. A concentração de todas as suspensões a serem utilizadas no preparo da ração ficou na ordem de 10^{12} UFC/mL de suspensão.

Tabela 5: Contagem de células viáveis antes e após o processo de fabricação da ração.

Ração	Quantidade adicionada	Contagem pós-preparo
Controle	-	10^1
A1 e B1	10^4	10^2
A2 e B2	10^6	10^4
A3 e B3	10^8	10^6

De acordo com os resultados da tabela 5 verifica-se que houve uma perda da ordem de duas potências no número de células viáveis durante o processo de fabricação em todas as rações experimentais.

V - DISCUSSÃO

A interação entre as bactérias presentes no ambiente aquático e os peixes se inicia nos primeiros momentos do desenvolvimento do indivíduo, quando este é apenas um ovo. No meio aquático, as bactérias transitam livremente entre o *habitat* e o hospedeiro, e é de fundamental importância para a piscicultura em geral que haja um bom entendimento de como se dá essa interação.

Horas após a fertilização, bactérias colonizam a superfície do ovo. A microbiota que se desenvolverá reflete aquela da água de cultivo, porém fatores como capacidade de adesão a sítios espécie-específicos, velocidade de crescimento e reprodução dos microrganismos afetam a composição de tal microbiota (Olafsen, 2001; Gatesoupe, 1999).

Antes mesmo do início da fase de alimentação exógena, bactérias já começam a colonizar o trato gastrointestinal. Hansen *et al.* (1992) mostraram a ocorrência de endocitose de bactérias na parte posterior do intestino em Herring (*Clupea harengus*), antes que ocorresse a abertura da boca da larva.

No início da fase larval existem poucas bactérias no trato gastrointestinal. Em larvas de turbot (*Scophthalmus maximus*), a população de bactérias associadas ao trato gastrointestinal cresce rapidamente, cerca de 10^2 UFC/larva antes do início da alimentação para 10^4 UFC/larva, um dia após o início da alimentação (Huys *et al.*, 2001).

Além disso, já foi claramente demonstrado que bactérias são abundantes no ambiente no qual os peixes vivem, e é impossível evitar que elas sejam componentes de sua dieta (Olafsen, 2001). Assim, as bactérias ingeridas junto com a água e alimentos podem se adaptar ao microambiente encontrado no trato gastrointestinal e estabelecer uma associação de mutualismo ou protocooperação (Saha *et al.*, 2006).

Segundo Irianto & Austin (2002) os benefícios associados para os peixes abrangem: a estimulação do sistema imunológico; alteração do metabolismo microbiano com aumento ou diminuição do nível de enzima e produção de compostos benéficos; exclusão competitiva de patógenos potenciais, devido à produção de compostos inibitórios, competição por nutrientes, espaço ou oxigênio.

Olafsen (2001) sugere que menos de 1% das bactérias presentes no ambiente de cultivo de peixes marinhos conseguem ser ativas e crescer em meios de cultura em condições de laboratório. Diferentemente dos animais terrestres, existe no trato gastrintestinal de peixes um fluxo contínuo de água. Portanto, a capacidade de aderir e formar uma comunidade permanente no intestino é um dos pré-requisitos básicos para considerar um microrganismo como probiótico. Como neste estudo, os peixes foram mantidos em jejum por 48h antes de terem o trato dissecado, as colônias isoladas possuem algum mecanismo de adesão, e foi assim reduzido o isolamento de bactérias ditas “de passagem” pelo trato gastrintestinal.

A contagem de bactérias no intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada em água salobra com temperatura média de 27,5° C na Arábia Saudita variou de $2,8 \pm 2,4 \times 10^7$ a $1,0 \pm 1,6 \times 10^8$ UFC/g (Al-Harbi & Uddin, 2005). Outro estudo quantitativo realizado na Arábia Saudita, com tilápias cultivadas em água doce na mesma temperatura de cultivo (28,8° C) encontrou valores da ordem de $6,8 \times 10^6$ a $7,5 \times 10^7$ UFC/g (Al-Harbi & Uddin, 2004).

Molinari *et al.* (2003) investigaram a microbiota de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada em sistema semi-intensivo no sul do Brasil (temperatura média anual de 22° C). O trato gastrintestinal foi dividido em três partes: estômago, intestino anterior e posterior, e o número de células cultiváveis encontrado variaram de $1,5 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^6$ UFC/g.

Al-Harbi & Uddin (2005) a quantidade de bactérias no trato gastrintestinal é diretamente proporcional à temperatura da água. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram tal afirmação. Assim como nos dois trabalhos realizados na Arábia Saudita, o número de UFC determinados neste estudo ficou na ordem de 10^8 , enquanto que no sul do Brasil (temperatura de cultivo de 22°C) o valor variou na ordem de 10^4 a 10^6 .

Um estudo realizado com linguado (*Solea solea*), uma espécie marinha que se alimenta de vermes, moluscos e pequenos crustáceos, demonstrou que a contagem de microrganismos no trato gastrintestinal é maior nos juvenis do que nos adultos. O trato gastrintestinal foi dividido em estômago, intestino médio e intestino terminal/reto e foram encontradas $5,2 \times 10^5$, $8,0 \times 10^5$ e $9,8 \times 10^6$ bactérias heterotróficas/g, respectivamente, nos juvenis e $3,0 \times 10^4$, $7,0 \times 10^4$ e $2,3 \times 10^5$ nos adultos. (MacDonald, *et al.*, 1986).

O nosso experimento representa o primeiro trabalho com a microbiota gastrintestinal do tambaqui cultivado na Amazônia.

Estudos a respeito da microbiota gastrintestinal de peixes são escassos e há certa falta de informações na área de atividade enzimática bacteriana no trato gastrintestinal de peixes e seu papel na digestão nesses animais. Entretanto, alguns trabalhos mostrando bactérias secretoras de enzimas digestivas no intestino de peixes estão disponíveis.

Bairagi *et al.* (2002) examinaram o trato gastrintestinal de nove espécies de peixes cultiváveis de água doce quanto à presença de bactérias secretoras de enzimas digestivas. Dentre elas, nas duas de hábito alimentar onívoro, a contagem dos isolados produtores de amilase, lipase e protease foram $12,4 \times 10^3$, $1,6 \times 10^3$ e $9,0 \times 10^5$ /g de

tecido para a tilápia (*Oreochromis mossambicus*), respectivamente, e $2,3 \times 10^3$, $1,3 \times 10^3$ e $7,2 \times 10^5$ /g de tecido para carpa indiana (*Catla catla*).

Em nosso estudo, ainda ficou evidenciada a relação entre o hábito alimentar do hospedeiro e o perfil enzimático da microbiota presente em seu intestino. Espécies carnívoras apresentaram maior quantidade de bactérias proteolíticas e lipolíticas, enquanto que espécies herbívoras apresentaram maior microbiota com atividade amilolítica. Entre esses dois extremos, a contagem dos isolados das espécies onívoras mostrou-se equilibrada entre as três atividades. O número de isolados produtores de amilase, protease e lipase, $1,31 \times 10^8$ UFC/g, $1,27 \times 10^8$ UFC/g, e $1,82 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente, encontrados neste trabalho mostrou-se em concordância com os resultados encontrados por Bairagi e colaboradores (2002).

MacDonald *et al.* (1986) em seu estudo com o linguado (*Solea solea* L.), verificaram ainda que, das 153 bactérias isoladas, 35 linhagens demonstraram capacidade de degradar p-nitrofenil- β -N-acetil-glicosaminida (PNP β -NAG), 50 linhagens foram capazes de degradar colágeno, sete linhagens de degradar quitina e 28 linhagens de degradar elastina.

Foram isoladas 46 linhagens secretoras de proteases, 29 linhagens secretoras de lipases e quatro linhagens secretoras de amilases do trato gastrointestinal do tambaqui neste trabalho. Esses resultados podem indicar que existe uma fonte exógena de enzimas digestivas no trato gastrointestinal desta espécie.

Ringo *et al.* (1995) afirmaram que microrganismos têm um efeito benéfico sobre o processo digestivo em peixes. A manipulação da microbiota gastrointestinal na piscicultura, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento do indivíduo pode resultar em aumento do desempenho zootécnico verificado.

Verificou-se que, em carpa comum (*Cyprinus carpio*), a atividade enzimática proteolítica aumentou consideravelmente quando foi fornecida ração adicionada de tripsina bovina (Dabrowski & Glogowski 1977), enquanto que os estudos de Das & Tripathi (1991) mostraram que a atividade proteolítica máxima tanto em juvenis quanto em adultos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) aumentou proporcionalmente ao aumento de proteína na dieta até um limite. A presença de bactérias secretoras de protease no intestino parece evidenciar a existência de uma microbiota dependente da dieta em peixes.

De-Schrijver & Ollevier (2000) demonstraram que a suplementação de *Vibrio proteolyticus*, uma bactéria secretora de protease, resultou em um aumento da digestibilidade aparente do nitrogênio e da quantidade de peptídeos de baixo peso molecular na parte posterior do intestino em relação ao grupo controle no cultivo de juvenis de uma espécie de linguado (*Scophthalmus maximus*).

Nunes *et al.* (2006) demonstraram que a inclusão das enzimas digestivas exógenas, como amilase e lipase, na ração melhorou o desempenho zootécnico de juvenis de tambaqui nos níveis de inclusão na ração de 0,05 e 0,2%, respectivamente.

Silva *et al.* (comunicação pessoal) verificaram que a adição de um complexo multi-enzimático composto por levedura seca de cana-de-açúcar, amilase, protease, celulase e lipase melhoraram a digestibilidade dos nutrientes e energia bruta na ração do tambaqui.

A análise quantitativa dos isolados produtores de protease indicou a presença de microrganismos com capacidade significativa em secretar tal enzima digestiva, abrindo perspectivas para avaliação de seu uso como um probiótico para a piscicultura.

A principal estratégia do uso de probióticos em aquicultura talvez seja o isolamento de microrganismos benéficos aos indivíduos adultos e inclusão de grandes

quantidades na alimentação dos indivíduos imaturos da mesma espécie (Gildberg *et al.*, 1997).

A presença de bactérias do gênero *Bacillus* tem sido amplamente descrita em peixes (Gatesoupe, 1999; Ringo & Birkbeck, 1999; Eddy & Jones, 2002), e alguns estudos indicam seu uso potencial como probiótico. Gatesoupe (1993) utilizou esporos de *Bacillus* sp. isolado como agente de biocontrole e enriquecimento nutricional de cultura de rotíferos para o cultivo do linguado (*Scophthalmus maximus*), enquanto que Kennedy *et. al* (1998) isolaram a espécie *Bacillus subtilis* do robalo (*Centropomus undecimalis*) e a utilizou para suprimir o patógeno *Vibrio* sp. na água de cultivo.

Gosh *et al* (2002a) isolaram três bactérias do trato gastrintestinal da carpa indiana (*Labeo rohita*) e identificaram-nas como sendo as espécies *Bacillus circulans*, *B. pumilus*, e *B. cereus*. As três bactérias demonstraram capacidade de secretar as enzimas protease, amilase e celulase, *in vitro*.

Os estudos de Gosh *et al.* (2002b) demonstraram que a inclusão das bactérias *Bacillus circulans*, *B. pumilus*, e *B. cereus* em dietas experimentais aumentou a taxa de crescimento e sobrevivência em estudo realizado com juvenis de carpa indiana (*Labeo rohita*).

Saha *et al.* (2006) estudando a microbiota gastrintestinal de tilápia (*Oreochromis mossambica*) e de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) selecionaram e identificaram bactérias secretoras de celulase. Posteriormente, os isolados foram identificados como *Bacillus megaterium* (CI13) e *B. circulans* (TM1), onde ambos foram testados quanto às atividades amilolítica e proteolítica. A atividade proteolítica, determinada como microgramas de tirosina liberadas por minuto, foi de 65,45 U para o isolado CI13 e 9,32 U para o isolado TM1.

Dentre as bactérias isoladas, o grupo de enzimas que mostrou maior frequência foram as proteolíticas. Considerando que a fração protéica constitui a parte da dieta que mais encarece o custo final da ração, e que fontes exógenas de enzima podem melhorar a digestibilidade dos ingredientes na ração, realizou-se a quantificação da atividade dos isolados que foram capazes de secretar a enzima proteolítica.

MacDonald, Stark & Austin (1986) isolaram 153 linhagens do trato gastrintestinal do linguado (*Solea solea* L.), dentre as quais oito pertencem ao gênero *Micrococcus* e demonstraram capacidade de degradar colágeno e elastina. Bactérias do gênero *Bacillus* também foram isoladas e identificadas neste trabalho.

Como a fração protéica é a parte que mais encarece o custo final da ração para peixes, os isolados com a maior atividade foram submetidos a um processo de inclusão na ração para avaliar a viabilidade do processo. Antes, porém, foram avaliados quanto à patogenicidade frente ao tambaqui. Entre quatro isolados testados, ocorreu a morte de um peixe com a linhagem T3P9. As características apresentadas mostram sinais típicos de infecção bacteriana. Não se pode afirmar, entretanto, que a *causa mortis* foi efetivamente a bactéria adicionada à água de cultivo sem um estudo histopatológico minucioso, nem o reisolamento e identificação do microrganismo patógeno suspeito de causar a morte do indivíduo, e que pudessem subsidiar tal dedução, já que este não foi o objetivo do trabalho. De qualquer forma, este isolado não foi utilizado nas etapas seguintes.

A suspensão de células dos isolados TP1, TP20 e T3P18 foram incluídas nas rações experimentais na quantidade de 10^8 , 10^6 e 10^4 UFC/g de ração. Após o processo de preparo da ração, a contagem de células viáveis decaiu duas potências em todas as rações. Apesar da perda, o processo foi considerado eficiente já que a queda da concentração ainda foi suficiente para manter níveis bacterianos significativos. É

necessária uma otimização do processo de produção da ração após a incorporação das bactérias para diminuir a perda de viabilidade das mesmas.

VI - CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que o tambaqui conta com uma fonte microbiana (portanto exógena) de enzimas digestivas (amilase, lipase e protease), além das fontes endógenas presentes no seu trato gastrointestinal. A atividade enzimática predominante das bactérias encontradas foi a proteolítica.

A microbiota gastrointestinal do tambaqui podem desempenhar um papel importante no processo digestivo desta espécie.

As linhagens TP1 (*Micrococcus* sp.), TP20 e T3P18 (ambos *Bacillus* spp.) representam espécies potenciais para uso como probióticos no cultivo do tambaqui.

A incorporação de microrganismos a ração de tambaqui (*C. macropomum*) mostrou-se viável.

VII - REFERÊNCIAS

- AL-HARBI, A. H. Faecal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture Research**, v.34, p. 517-524, 2003.
- AL-HARBI, A. H. & UDDIN, M. N. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v.229, p.37-44, 2004.
- AL-HARBI, A. H. & UDDIN, M. N. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. **Aquaculture**, v.250, p.566-572, 2005.
- AKIYAMA, D. Soybean meal utilization in fish feeds. American Soybean Association. Presented at the Korean Feed Association, Seoul, Korea, 1998. Disponível em: <http://www.asasea.com/aq_88.html>. Acesso em: 08/07/2006.
- BAIRAGI, A.; GHOSH, S. K.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v.10, p.109-121, 2002.
- BERGH, Ø; HJELTNES, B.; SKIFTESVIK, A. B. Experimental infection of turbot *Scophthalmus maximus* and halibut *Hippoglossus hippoglossus* yolk sac larvae

with *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*. **Dis. Aquat. Org.**, v.29, p.605-12, 1997.

BEVERIDGE, M. C. M.; SIKDAR, P. K.; FRERICHS, G. M.; MILLAR, S. The ingestion in bacteria suspension by the common carp *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v.39, p.835-831, 1991.

CHENG, Z. J. ; HARDY, R. W.; ESRY, J. L. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and apparent digestibility coefficients of nutrients. **Aquaculture**, v.215, p.255-265, 2003.

DABROWSKI, K. & GLOGOWSKI, J. Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates constituting fish food. **Hydrobiologia**, v.52, p.171-174, 1977.

DAS, K. M. & TRIPATHI, S. D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Aquaculture**, v.92, p.21-32, 1991.

DE-SCHRIJVER, R. & OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, v.186, p. 107-119, 2000.

DERSJANT-LI, Y. The use of soy protein in aquafeeds. IN: CRUZ-SUÁREZ; L. E., RICQUE-MARIE; D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GAXIOLA-CORÉS, M. G.; SIMÕES, N. (Eds). Avances em Nutrição Acuicola VI. **Memórias del VI**

Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002.
Cancun, Quintana Roo, México.

EDDY, S. D. & JONES, S. H. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. **Aquaculture**, v.211, p.9-28, 2002.

EYA, J. C. & LOVELL, R. T. Net absorption of dietary phosphorous from various inorganic sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phosphorous by channel catfish *Ictalurus punctatus*. **J. World Aquaculture Soc.**, v.28, p.386-391, 1997.

FAO. Food and Agricultural Organization Aquaculture Production Statistics 1988-1997. Food and Agricultural Organization, Rome, 1999.

GATESOUBE, F.J. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L.. In: KAUSHIK, S.J., LUGUET, P. (Eds.), **Fish Nutrition in Practice.** Les Colloques, vol. 61. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, p. 561– 568, 1993.

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

GHOSH, K.; SEN, S. K.; RAY, A. K.. Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton)spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v.32, n.1, p.83-92, 2002a.

GHOSH, K.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of bacilli isolated from gut of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. **Journal of Applied Aquaculture**, v.12, n.3, p.33-42, 2002b.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.; RINGO, E. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, v.352, p.279-285, 1997.

GILDBERG, A. & MIKKELSEN, H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. **Aquaculture**, v.167, p.03-13, 1998.

GOODRICH, T. D. & MORITA, R. Y. Bacterial chitinase in the stomachs of marine fishes from Yaquina Bay, Oregon, USA. **Mar. Biol.**, v. 41, p.355-360, 1977.

GOULDING, M. Flooded forests of the Amazon. **Scientific American**, v.268, p. 114-120, 1993.

HANSEN, G. H.; STROM, E.; OLAFSEN, J. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of Herring (*Clupea harengus*). Larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, n.2, p.461-470, 1992.

HANSEN, G.H. & OLAFSEN, J.A Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. **Microbial Ecology**, v.38, p.1-26, 1999.

HARDY, R. W. Aquaculture`s rapid growth requirements for alternate protein sources. **Feed Manegement**, v.58, p.25-28, 1999.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology**, 9th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 787 pp., 1994.

HUYS, L., DHERT, P., ROBLES, R., OLLEVIER, F., SORGELOOS, P., SWINGS, J. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. **Aquaculture**, v.193, p.25-37, 2001.

IBAMA: **Estatística da Pesca Brasil: Grandes regiões e Unidades da federação**. Brasília, DF, 2005.

IRIANTO, A. & AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **J. Fish Dis.**, v.25, p.633-642, 2002.

JACKSON, L. S.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorous. **J. World Aquaculture Soc.**, v.31, p.402-406, 1996.

KENNEDY, S. B.; TUCKER, J. W.; NEIDIG, C. L.; VERMEER, G. K.; COOPER, V. R.; JARRELL, J. L.; SENNETT, D.G. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). **Bull. Mar. Sci.**, v.62, p. 572-588, 1998.

KOCH, A. L. Growth measurement. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação de peixes cultivados**. Campo Grande, MS, 44p, 1998.

LARA-FLORES, M.; OLIVERA-NOVOA ,M. A.;GUZMÁN-MÉMDEZ, B. E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, p.193-201, 2003.

LEGATE, N. J.; BONEN, A.; MOON, T. W. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguila*

rostrata) and black bullhead catfish (*Ameirus melas*). **General and Comparative Endocrinology**, v.122, p.48-59, 2001.

LIM, C. & AKIYAMA, D. M. Full-fat soybean utilization by fish. **Asian Fisheries Society** v.5, p.181-197, 1992.

MACDONALD, N. L.; STARK, J. R.; AUSTIN, B. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. **FEMS Microbiology Letters**, v.35, n.107-111, 1986.

MANGOR-JENSEN, A., ADOFF, G. R. Drinking activity of the newly hatched larvae of cod *Gadus morhua* L. **Fish Physiol. Biochem.** v.3, p. 99-103, 1987.

MOLINARI, D. O. S.; PEDROSO, R. B.; BITTENCOURT, N. L. R.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU-FILHO, B. A.; DIAS-FILHO, B. P. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, nº. 2, p. 267-271, 2003.

MURO, M. A. & LUCHI, M. R. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Toselo”, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUCIL (NRC) **Nutrients requirements of fish**. National Academy Press, Washington, DC, 1993.

- NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.
- OLAFSEN, J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. **Aquaculture**, v.200, p.223-248, 2001.
- OLSSON, J. C., WESTERDAHL, A., CONWAY, P. L., KJELLEBERT, S. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p. 551-556, 1992.
- ONO, E.A. Cultivar peixes na Amazônia: possibilidade ou utopia? **Panorama da Aqüicultura**, v.90, p.41-48, julho/agosto 2005.
- REITAN, K. I., NATVIK, C. M., VADSTEIN, O. Drinking rate, uptake of bacteria and microalgae in turbot larvae. **J. Fish Biol.**, v.53, p.1145-1154, 1998.
- RINGO E.; STROM E. ; TABACHEK J. A. Intestinal microflora of salmonids: a review. **Aquaculture Research**, v.26, p.773–789, 1995.
- RINGO, E. & BIRKBECK, T. H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 73– 93, 1999.

- RINGØ, E. & VADSTEIN, O. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. **J. Appl. Bacteriol.**, v.84, p. 227–233, 1998.
- SAHA, S.; ROY, R. N.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v.37, p.380-388, 2006.
- SAINT-PAUL, U. The potential for *Colossoma macropomum* culture in Latin America. **Infofish International**, v.2, p.49-53, 1991.
- SCHAFFER, A.; KOPPE, W. M.; MEYER-BURGDORFF, K. H.; GUNTHER, K. D. Effects of a microbial phytase on the utilization of native phosphorous by carp in a diet based on soybean meal. **Wat. Sci. Tech.**, v.31, p.149-155, 1995.
- SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, I. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) natural diets. **Rev. Bras. De Biologia**, v.60, n.4, p.1-7, 2000.
- SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, I. Valor nutricional e energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. **Acta Amazônica**, v.33, n.4, p.687-700, 2003.

SMIBERT, R. M. & KRIEG, N. R. Phenotypic characterization. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994.

STROM, E. & RINGØ, E. Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* L., larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In: Walther, B., Fyhn, H.J. (Eds.). **Physical and Biochemical Aspects of Fish Larval Development**. Grafisk Hus, Bergen, p.226-228, 1993.

SUGITA, H., ENOMOTO, A., DEGUCHI, Y. Intestinal micro-flora in the fry of *Tilapia mossambica*. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, v. 48, p.875, 1982.

SUGITA, H., MIYAJIMA, C., DEGUCHI, Y. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. **Aquaculture**, v.92, p 267-276, 1991.

SUGITA, H.; SHIBUYA, K.; SHIMOOKA, H.; DEGUCHI, Y. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. **Aquaculture**, v.145, p.195-203, 1996.

SWICK, R. A.; AKIYAMA, D. M.; BOONYARATPALIN, M.; CRESWELL, D. C. Use of soybean and synthetic methionine in shrimp feed. **American Soybean Association, Technical Bulletin**, 1995.

SYVOKIEN, J.; MICKJNIEN, L. Microorganisms of the digestive tract of hydrobionts as indicators of pollution. ICES Symposium on Brackish Water Ecosystems, Helsinki, 25–28 August 1998.

TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, O. C. C.; MACHUCA, A.; DURÁN, N. Determinação qualitativa de proteases. **Revista da Universidade do Amazonas, Manaus**, v.1, n.1/2, p. 39-45, 1996.

TRUST, T. J. & SPARROW, R. A. H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. **Canadian Journal of Microbiology**, v.20, p.1219-1228, 1974.

TYLER, P. & BLAXTER, J. H. S. Drinking in yolk-sac stage larvae of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). **J.Fish Biol.**, v.32, p.493-494, 1988.

VAL, A. L. & HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: INPA, 165p, 1995.

VAN DER MEER, M. B.; HUISMAN, E. A.; VERDEGEM, M. C. J. Feed consumption, growth and protein utilization of *Colossoma macropomum* (Cuvier) at different dietary soya meal/ fish meal ratios. **Aquaculture Research**, v.27, p.531-538, 1996.

VAN DER MEER, M. B.; FABER, R.; ZAMORA, J. E.; VERDEGEM, M. C. J. Effect of feeding level on feed losses and feed utilization of soya and fish meal

diets in *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.28, p.391-403, 1997.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Arch. Anim. Nutr.**, v.40, p.543-567, 1990.

VÁSQUEZ, L. K. **Variação circadiana da atividade das enzimas digestivas amilase, maltase, protease e lipase em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characiformes, Serrasalminidae).** 2001. 56f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus.

VINE, N.G; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. **FMES Microbiology Letters**, v.231, p.145-152, 2004.

WESTERDAHL, A.; OLSSON, J. C.; KJELLEBERG, S.; CONWAY, P. L. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2223-2228, 1991.