

EFEITO DO PROBIÓTICO *Bacillus subtilis* NO CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E FISIOLOGIA DE RÃS-TOURO (*Rana catesbeiana*)

Fernanda Menezes FRANÇA ¹; Danielle de Carla DIAS ²; Patrícia Coelho TEIXEIRA ²; Adriana Sacioto MARCANTÔNIO ³; Marta Verardino De STÉFANI ²; Antônio ANTONUCCI ¹; Guilherme da ROCHA ¹; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA ¹; Cláudia Maris FERREIRA ¹

RESUMO

Os probióticos são microorganismos vivos, em estado de latência que, adicionados ao alimento, beneficiam o desenvolvimento dos animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do probiótico *Bacillus subtilis* em diferentes doses sobre o crescimento, sobrevivência, análises imunológicas e hematológicas de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) recém metamorfoseadas. O teste foi desenvolvido no Ranário Experimental da Secretaria da Agricultura, em Pindamonhangaba, SP. Foram utilizadas três doses do probiótico (T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração), misturado diretamente à ração. O teste foi conduzido com três réplicas simultâneas e um grupo controle. Os animais foram alimentados previamente com esta dieta por 14 dias e acompanhados por 42 dias após a metamorfose. As biometrias foram realizadas a cada 7 dias. Foram avaliados o peso final, a taxa de sobrevivência, a capacidade fagocítica e o índice fagocítico. Para as análises hematológicas foram determinados hematócrito, taxa de hemoglobina, número de eritrócitos, índices hematimétricos absolutos (VCM e CHCM), além da contagem diferencial e total de leucócitos e contagem total de trombócitos. Os resultados obtidos indicaram que o peso final e a sobrevivência não sofreram influência das doses do probiótico testado. As análises imunológicas mostraram que o probiótico apresentou efeito imunoestimulador, mas não influenciou os parâmetros hematológicos dos animais.

Palavras-chave: Rã-touro, *Rana catesbeiana*, probiótico, desempenho, hematologia, imunologia

EFFECT OF THE PROBIOTIC *Bacillus subtilis* ON GROWING, SURVIVAL AND FISIOLGY IN THE BULLFROG (*Rana catesbeiana*)

ABSTRACT

The probiotics are live microorganisms, in latency state, that benefices the development of the animals. The objective of this work was to evaluate the effect of the *Bacillus subtilis* in different doses about the growing, survival and immunological and hematological analyses in the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) froglets. The test was developed in Experimental Frog farm of Agriculture Department, Pindamonhangaba, SP. Three doses of probiotics were tested (T1 - 2.5 g/Kg, T2 - 5 g/Kg and T3 - 10 g/Kg of food). The test was carried out with three simultaneous replicates, plus control group. The products were added to froglet's diet and mixed to the meal. The animals were previously feed with this diet for a period of 14 days and accompanied for about 42 days after metamorphose. Biometrics were performed every 7 days. It was evaluated the final weight, the survival, phagocytic capacity, phagocytic index and hematological analyses as hematocrit, hemoglobin level, erythrocyte number, absolute indices hematimetrycs (MCV and MCHC), differential counting of leucocytes and total counting of leucocytes and trombocytes. The results had shown that the doses of the probiotics had produced none effect on the final weight and survival. The immunological analyses had shown that the probiotics have presented immunostimulator effect, but haven't influenced the hematological parameters of the animals.

Key-words: Bullfrog, *Rana catesbeiana*, probiotic, performance, hematology, immunology

Artigo Científico: Recebido em: 04/07/2007; Aprovado em: 12/12/2007

¹ Instituto de Pesca - APTA/SAA

² CAUNESP - Centro de Aqüicultura da UNESP - Jaboticabal

³ Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba - Pindamonhangaba - APTA Regional/SAA

INTRODUÇÃO

A ranicultura é uma atividade que vem crescendo de forma acelerada no Brasil e em outros países. As principais modificações que ocorreram na ranicultura, com relação à alimentação, surgiram a partir da década de 80. Atualmente são utilizadas rações comerciais, formuladas e balanceadas, na sua maioria, a partir do conhecimento das exigências nutricionais de peixes, uma vez que ainda não se dispõe de informações suficientes sobre as necessidades nutricionais das rãs (STÉFANI, 2001).

O alto custo de produção, devido principalmente ao elevado preço das rações comerciais, tem levado os pesquisadores a estudarem formas de aumentar a eficiência alimentar e a taxa de crescimento dos girinos e rãs. Em outras espécies animais, aditivos alimentares conhecidos como probióticos têm apresentado resultados promissores. Eles são compostos por microrganismos vivos, em estado de latência, que afetam benéficamente o desenvolvimento dos organismos por propiciar-lhe equilíbrio da microbiota intestinal desejável (CASTRO, 2003).

Para exercer efeito um organismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999). Para GUZMÁN (1992), a ação benéfica do uso de probióticos ocorre de duas formas: a primeira determina melhores índices zootécnicos (maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar) e a segunda, reduz a colonização intestinal por alguns patógenos.

O mecanismo de ação dos probióticos ainda não está inteiramente elucidado. São atribuídas a eles várias ações positivas como o auxílio na digestão e absorção de nutrientes; ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas); produção de ácido lático que reduz o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano (FULLER, 1977); produção de metabólitos que inibem bactérias Gram negativas e positivas patogênicas; competição por sítios de adesão; produção de vitaminas do grupo B (FULLER, 1989); estímulo do sistema imune através da ativação dos macrófagos; ativação do sistema imune contra células malignas e, restauração da microbiota intestinal (CASTRO, 2003).

Através do estudo do sangue em seus aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos, podem-se

obter informações sobre o estado geral do animal (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Entretanto, principalmente por serem animais ectotérmicos, o quadro hematológico dos anfíbios pode variar de acordo com as condições em que o animal se encontra, como clima, alimentação, idade (estágio de desenvolvimento), peso, sexo (HARRIS, 1972; PENHA *et al.*, 1996; PALENSKE e SAUNDERS, 2003; FIORANELLI *et al.*, 2003, 2004; COPPO *et al.*, 2005).

O sangue dos anfíbios é composto por plasma, eritrócitos, leucócitos e trombócitos. DIAS (1992) relatou a carência de informações sobre a composição celular do sangue de anfíbios. Mas artigos recentes como FERREIRA *et al.* (2003), FIORANELLI *et al.* (2004) e COPPO *et al.* (2005) vem abordando cada vez mais este assunto.

Segundo WIRZ *et al.* (1992) a fase crítica da produção de rãs-touro é a fase pós-metamorfose, momento em que os animais encontram-se mais vulneráveis as variações ambientais, ocorrendo altas taxas de mortalidade. O período de metamorfose caracteriza-se por modificações na morfologia e fisiologia das rãs, para possibilitar a sua sobrevivência no ambiente terrestre (LIMA e AGOSTINHO, 1992). Trata-se de um processo fisiológico contínuo em que os animais se tornam imunologicamente mais sensíveis e susceptíveis às agressões ambientais (HORTON, 1994). Neste período é imprescindível evitar-se contaminações por agentes patológicos. Desta forma, pretendia-se, com a incorporação do probiótico *B. subtilis* à dieta de girinos durante a metamorfose, e nos primeiros 42 dias após ela, reduzir a alta mortalidade (cerca de 30%) encontrada nas criações comerciais (WIRZ *et al.*, 1992; FONTANELLO e FERREIRA, 1999; FERREIRA *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do probiótico composto por *Bacillus subtilis* em diferentes doses sobre o desempenho (ganho de peso, sobrevivência e conversão alimentar), quadro imunológico e hematológico de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) recém-metamorfoseadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no ranário experimental do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba (PRDTAVP), em Pindamonhangaba/SP/Brasil. Foram utilizados 240 imagos de rã-touro (*Rana*

catesbeiana), com peso médio inicial de $3,13 \pm 0,12$ g tratados com probiótico *Bacillus subtilis* (10^9 UFC/g) em sua fase final de girinagem (14 dias antes da metamorfose ser completada).

O teste foi conduzido com 4 tratamentos (C - Controle, T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração), com três réplicas simultâneas, totalizando 12 baias semi-secas, medindo 1,0 x 1,5 m cada. O probiótico em pó foi adicionado diretamente à ração extrusada (40% PB, 6% FB, 8% EE), sendo aderido à superfície do pelet. A alimentação foi fornecida diariamente em cochos localizados na área seca da baía, para induzir as rãs a se alimentar foram adicionadas larvas mosca à ração. Os animais foram acompanhados por 42 dias após a metamorfose, e as biometrias realizadas a cada 7 dias. As temperaturas máximas e mínimas foram monitoradas diariamente.

Para determinar o desempenho de produção foram avaliados, ao final do experimento, o ganho de peso (GP), a taxa de sobrevivência (S) e a conversão alimentar (CA) através das fórmulas: GP = peso final - peso inicial; S = (total de rãs final / total de rãs inicial) X 100; CA = ração fornecida / ganho de peso.

Ao final do experimento utilizaram-se seis animais de cada tratamento para a realização dos testes imunológicos. Injetou-se 2 mL de uma solução da levedura *Sacharomyces cerevisiae* com concentração de 11.000 cel/mm^3 na cavidade abdominal. Após o período de 1:30h de incubação, os animais inoculados com a levedura foram anestesiados em solução de benzocaína (1g de benzocaína/1L de água) e sacrificados por secção da medula espinhal (porção cervical). Após o sacrifício foi feito um corte na lateral do abdome, por onde foi realizado o lavado da cavidade abdominal com solução de Ringer para Anfíbios. Esse processo foi realizado com cuidado para que o lavado não fosse contaminado por sangue da cavidade abdominal. O líquido aspirado da cavidade abdominal foi centrifugado a 1.500 rpm, por 5 minutos, em tubo plástico. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso, colocado entre lâmina e lamínula e levado ao microscópio de contraste de fases para contagem de fagócitos. Com os resultados das contagens do número de fagócitos ativos e do número total de leveduras no interior das células fagocíticas foram calculados os valores de Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) segundo metodologia descrita por SILVA *et al.*

(2002, 2005), conforme as fórmulas: CF = número de fagócitos fagocitando / 100 fagócitos e IF = número total de leveduras fagocitadas / número de fagócitos fagocitando.

Para as análises hematológicas foram retiradas amostras de sangue de outros seis animais de cada tratamento através de punção da artéria ciática, depois de feita anestesia local (lidocaína). Com o sangue coletado foi realizada a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer; determinação do hematócrito pelo método de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971); e da taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944); foram feitas extensões sanguíneas, coradas pelo método de ROSENFELD (1947) para a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de leucócitos e trombócitos. Com os valores obtidos da contagem de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos absolutos segundo WINTROBE (1934): volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Com a finalidade de verificar diferenças das médias de desempenho (ganho de peso, sobrevivência e conversão alimentar), parâmetros imunológicos e hematológicos, entre os grupos tratados com probiótico e o grupo controle, foi realizada a análise descritiva das variáveis do estudo, apresentadas em termos de seus valores de tendência central e de dispersão. Foram realizados testes para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias (D'Agostino-Pearson e Bartlett), e para constatação de diferenças significativas entre tratamentos realizou-se análise de variância (ANOVA-1 fator) seguida pelo teste de Tukey. A relação entre as variáveis dependentes e independentes foi verificada através de teste de regressão. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As temperaturas médias máximas e mínimas do ambiente nas baias foram de $33,3 \pm 3,4^\circ\text{C}$ e $16,0 \pm 2,7^\circ\text{C}$, respectivamente.

O peso médio dos imagos durante o experimento, em cada tratamento, encontra-se na Figura 1.

Pode-se verificar através dos dados apresentados que o peso médio dos imagos foi similar entre os grupos testados, observando-se peso médio um

pouco superior nos grupos tratados com probiótico ao final do experimento, mas que não diferiram estatisticamente ($p=0,74$). Em experimento realizado por DIAS (2006), com *Rana catesbeiana* tratadas por um período de 112 dias com dois probióticos diferentes: P1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*

bifidum e *Enterococcus faecium*; P2 - *Bacillus subtilis*, foi observado aumento do ganho de peso nas rãs alimentadas com probiótico até atingirem 200g, independente da dose utilizada (5 ou 10g/kg ração).

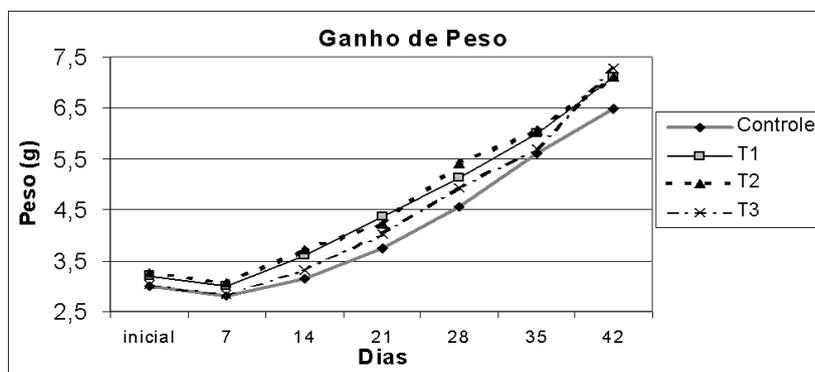


Figura 1- Peso médio (g) de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento durante o teste com probiótico. T1 - 2,5 g/Kg de ração, T2 - 5 g/Kg de ração e T3 - 10 g/Kg de ração

O ganho de peso médio, conversão alimentar e sobrevivência dos imagos ao final do experimento, em cada tratamento, encontram-se na Tabela 1.

O ganho de peso foi mais elevado no Tratamento 3 (10 g/Kg), com a dose mais elevada de probiótico, mas não diferiu estatisticamente dos demais.

Tabela 1 - Ganho de peso (g), conversão alimentar (CA) e sobrevivência (%) de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento durante o teste com probióticos

Tratamentos	Ganho de Peso (g)	CA	Sobrevivência (%)
Controle	3,45	4,85	94,34
T1	3,92	8,03	83,33
T2	3,82	5,57	92,59
T3	4,25	4,65	84,31
F	0,14 ^{NS}	0,71 ^{NS}	0,41 ^{NS}
CV (%)	34,12	53,23	15,77

NS - Não significativo; CV - Coeficiente de variação

Durante este experimento não foi obtida boa conversão alimentar em nenhum dos grupos. Este resultado se deu, provavelmente, pela dificuldade de coleta dos restos de rações para o cálculo da conversão, em virtude das instalações (pouca profundidade dos cochos) e por se tratar de um período em que os animais ainda estão se adaptando à alimentação fora da água (caça e condicionamento). Estes fatores, somados à presença de uma cauda rudimentar (clímax da metamorfose) ocasionou perda de peso dos animais na primeira semana após a metamorfose, além da perda de ração na água de escoamento.

O grupo controle e o tratamento 2 apresentaram

sobrevivência discretamente maior durante a experimentação, embora a análise estatística para estes dados indicou não haver diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0,75$).

Apesar de não haver diferenças significativas das médias de desempenho (peso, sobrevivência e conversão alimentar) entre o grupo controle e os grupos tratados, deve-se lembrar que os probióticos têm sua ação evidenciada em períodos de baixa resistência, tais como estresse, vacinações e contaminação por bactérias prejudiciais aos organismos, o que não aconteceu neste trabalho. Em outras palavras, como afirmam CANADELL e GARCIA (1992), é crítico manter-se a flora intestinal

“saudável” durante tais períodos de instabilidade, fato este constatado nesta experimentação.

Os resultados das análises imunológicas em imagos estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

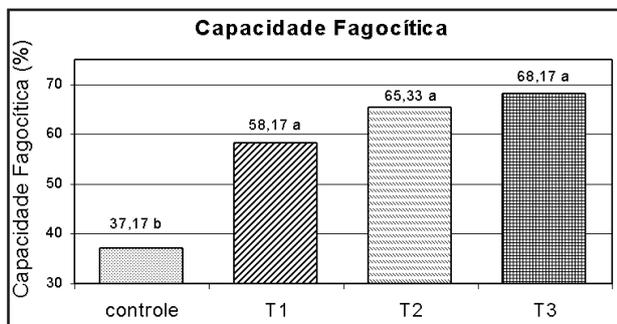


Figura 2 - Médias da freqüência percentual por tratamento (T) da Capacidade Fagocítica de imagos de *R. catesbeiana* no teste com probiótico. T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração. Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

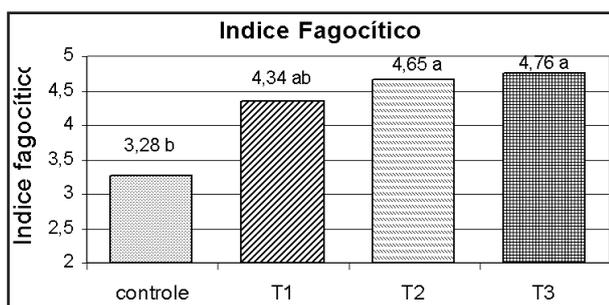


Figura 3 - Médias por tratamento (T) do Índice Fagocítico de imagos de *R. catesbeiana* no teste com probiótico. T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração. Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com os resultados obtidos pode-se observar que a capacidade fagocítica dos animais foi influenciada positivamente pelo probiótico, sendo altamente significativa ($p=0,0019$). Os animais tratados com este produto apresentaram melhor capacidade fagocítica quando comparados com o grupo controle, sendo que a dose utilizada não influenciou significativamente os resultados (Figura 2). O índice fagocítico também foi influenciado pelo probiótico ($p=0,0078$), apresentando melhores resultados nas maiores doses utilizadas (T2 e T3), e não apresentando diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes doses de probióticos (Figura 3).

Foram observadas células fagocíticas ativas no lavado abdominal (com leveduras em seu interior), e o número de leveduras no interior de cada célula, como mostra a Figura 4.

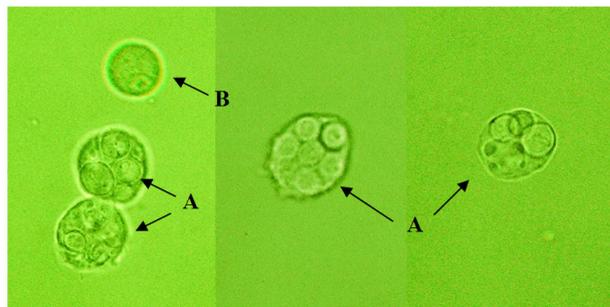


Figura 4 - Fotomicrografia de células fagocíticas presentes em lavado abdominal de imagos de rã-touro. (A - células fagocitando leveduras e B - célula fagocítica inativa). Microscópio de contraste de fases. Aumento de 400 X

A análise de regressão revelou efeitos significativos para as variáveis dependentes (capacidade fagocítica e índice fagocítico) para o componente quadrático gerando as equações: $CF = 37,98 + 8,60 \text{ dose} - 0,56 \text{ dose}^2$ e $IF = 3,32 + 0,43 \text{ dose} - 0,03 \text{ dose}^2$. Através do cálculo da derivada dessas equações encontramos o ponto de máxima resposta da capacidade fagocítica e do índice fagocítico, indicando as doses de probiótico ministrado que apresentariam melhores resultados, sendo 7,17g/Kg de ração para CF e 7,68g/Kg de ração para IF.

DIAS (2006) analisando a capacidade e o índice fagocítico de rãs-touro na fase de engorda, tratadas com diferentes probióticos e doses, também observou influência positiva da capacidade fagocítica em rãs alimentadas com este produto. Este autor verificou no grupo controle capacidade fagocítica de $48,2 \pm 4,19 \%$, enquanto que nos tratamentos que utilizaram probióticos, observou média de $80,83 \pm 3,8 \%$. Para o índice fagocítico, entretanto, não foram observadas influências significativas, obtendo resultados variando entre 3,39 a 3,93.

Segundo CROSS (2002) tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune, apesar dos mecanismos pelos quais os probióticos estimulam a imunidade dos animais ainda não estarem esclarecidos. Segundo COPPOLA e GIL-TURNES (2004), bactérias do gênero *Bacillus* podem estimular a resposta imune e serem utilizadas como imunomoduladores. Esta

habilidade das bactérias probióticas em modular a imunidade e aumentar o balanço microbiano de microrganismos entéricos comensais, oferece uma alternativa biologicamente efetiva para melhorar a saúde sem recorrer ao consumo de drogas alopáticas (KAILASAPATHY e CHIN, 2000).

Os resultados das análises hematológicas estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados apresentados mostram que os

parâmetros hematológicos dos imagos tratados com probiótico não diferiram significativamente entre os tratamentos. Apenas os valores de CHCM diferiram significativamente quando se compara o T1 com o T2, apresentando valores inferiores no Tratamento 2, o que não demonstra estar relacionado com o uso do probiótico. Apesar de não apresentar diferenças significativas, podemos observar discreto aumento nos valores de hematócrito e número de eritrócitos à medida que se elevou a dose do probiótico.

Tabela 2 - Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de imagos de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) em cada tratamento (T) no teste com probiótico

	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
Controle	20,08 ± 1,57	4,97 ± 0,55	33,83 ± 4,53	642,6 ± 89,5	24,75 ± 1,72 ^{ab}
T1	21,25 ± 1,09	6,04 ± 0,58	41,42 ± 2,46	523,9 ± 45,3	28,22 ± 1,65 ^a
T2	23,67 ± 2,26	4,65 ± 0,61	39,25 ± 3,69	606,0 ± 32,0	19,84 ± 1,88 ^b
T3	24,50 ± 0,89	6,23 ± 0,40	46,42 ± 3,40	538,0 ± 33,3	25,29 ± 0,80 ^{ab}
F	1,77 ^{NS}	2,06 ^{NS}	2,09 ^{NS}	1,04 ^{NS}	4,90 [*]

T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração. NS = Não significativo

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos ($10^4/mm^3$); VCM = volume corpuscular médio (fL); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DIAS (2006) testando diferentes probióticos e doses em rãs-touro também não observou influência destes produtos nos valores hematológicos.

Os resultados observados no presente trabalho encontram-se próximos aos valores encontrados por COPPO (2003) e DIAS (2006), que avaliaram os parâmetros hematológicos de *Rana catesbeiana* com peso médio de 200 g. COPPO (2003) obteve valores de hematócrito variando de 28,6 a 31,6%, e DIAS (2006) obteve valores entre 27,25 e 30,17% para este parâmetro. Os valores de hemoglobina encontrados na literatura para *Rana catesbeiana* foram de 6,41 a 7,20 g/100mL (COPPO, 2003), 8,93 a 9,90 g/100mL (DIAS, 2006) e, em rãs mais jovens FIORANELLI *et al.* (2004) obteve valores mais baixos de hemoglobina, com média de 5,9 g/100mL, valor que se aproxima mais aos resultados do presente trabalho. Na contagem de eritrócitos DIAS (2006) obteve valores variando de 31,67 a 47,67 $\times 10^4/mm^3$ e COPPO (2003) 40 a 44 $\times 10^4/mm^3$. Segundo FIORANELLI *et al.* (2004), os valores de hematócrito, eritrócito e hemoglobina aumentam à medida que se avança a idade em *Rana catesbeiana*.

Os valores de VCM e CHCM encontrados neste trabalho, também se aproximam dos valores encontrados na literatura, sendo que os valores de VCM encontrados por COPPO (2003) variavam de

686 a 732 fL e por DIAS (2006) 713,6 a 947,6 fL; e os valores de CHCM foram de 22,6 a 24,0 % (COPPO, 2003) e 32,35 a 33,96 (DIAS, 2006).

Os valores médios e erro padrão da contagem de trombócitos por milímetro cúbico ao final do experimento foram de 613,76 ± 479,93 para o controle, 210,19 ± 94,92 para o Tratamento 1, 1180,83 ± 471,15 para o Tratamento 2 e, 359,97 ± 230,90 para o Tratamento 3. Os resultados dos valores da contagem de trombócitos mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0,27$). Os trombócitos são considerados como responsáveis pelo processo de coagulação do sangue (CASILLAS e SMITH, 1977), desempenhando papel análogo às plaquetas dos mamíferos (PENHA *et al.*, 1996).

Os números absolutos médios dos leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos (CDL) em imagos ao final do experimento encontram-se na Tabela 3, e os valores em percentual da CDL encontram-se na Tabela 4. Os leucócitos encontrados no sangue dos imagos durante a contagem diferencial estão apresentados na Figura 5.

Os valores médios dos leucócitos, tanto em valores absolutos quanto em porcentagem não demonstraram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, apesar de apresentar uma tendência de diminuição dos valores absolutos

de leucócitos totais e de linfócitos conforme se aumentou a dose do probiótico.

Os valores de leucócitos totais encontrados no presente trabalho variaram de 13.929,16 a 21.498,59/

mm³. Estes valores encontram-se superiores aos observados por DIAS (2006) em *Rana catesbeiana* na fase adulta (8.026,97 a 11.222,99/mm³) e por HARRIS (1972) em *Rana pipiens* (4.000 a 16.000).

Tabela 3: Médias e erro padrão dos números absolutos de leucócitos e da contagem diferencial de leucócitos de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento (T) no teste com probiótico

	Lc T/mm ³	Lf/mm ³	Nt/mm ³	Bs/mm ³	Es/mm ³	Mn/mm ³
Controle	20.214,26 ± 5.669,82	17.736,23 ± 5.104,20	1.139,32 ± 320,00	1.210,64 ± 454,33	249,64 ± 66,01	24,67 ± 20,59
T1	21.498,59 ± 3.738,00	16.830,21 ± 2.893,57	2.484,57 ± 673,07	1.382,76 ± 369,66	633,48 ± 242,87	167,56 ± 43,37
T2	18.104,03 ± 3.180,66	15.168,69 ± 2.755,41	1.372,40 ± 424,80	1.156,48 ± 318,21	343,20 ± 68,45	63,26 ± 40,31
T3	13.929,16 ± 2.420,75	11.372,84 ± 2.322,90	1.359,92 ± 483,53	894,49 ± 180,61	216,54 ± 66,65	85,38 ± 33,80
F	0,71 ^{NS}	0,67 ^{NS}	1,52 ^{NS}	0,36 ^{NS}	1,98 ^{NS}	2,87 ^{NS}

T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração. NS = Não significativo

Lc T = Leucócitos totais; Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito

Tabela 4: Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento (T) no teste com probiótico

	Lf (%)	Nt (%)	Bs (%)	Es (%)	Mn (%)
Controle	87,10 ± 1,69	6,12 ± 0,85	5,23 ± 1,62	1,31 ± 0,11	0,24 ± 0,17
T1	79,17 ± 3,16	10,59 ± 2,10	6,64 ± 1,46	2,65 ± 0,93	0,96 ± 0,28
T2	83,58 ± 2,63	7,96 ± 1,86	6,29 ± 1,02	1,84 ± 0,28	0,32 ± 0,20
T3	80,69 ± 3,97	9,78 ± 3,11	7,35 ± 1,70	1,46 ± 0,31	0,72 ± 0,32
F	1,37 ^{NS}	0,89 ^{NS}	0,36 ^{NS}	1,37 ^{NS}	1,82 ^{NS}

T1 - 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração. NS = Não significativo

Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito

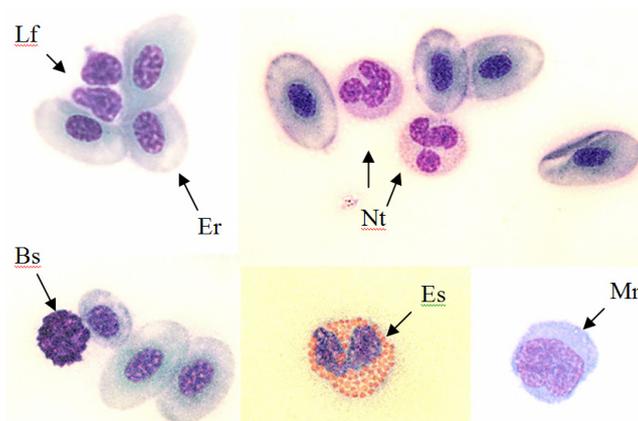


Figura 5: Fotomicrografia da extensão sanguínea de imagos de rã-touro no teste com probiótico. Er = Eritrócito, Lf = Linfócito, Nt = Neutrófilo, Bs = Basófilo, Es = Eosinófilo e Mn = Monócito. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000 X

Os valores de linfócitos também se encontram superiores aos observados por outros autores, mas que por sua vez trabalharam com rãs adultas: 52,77% (WANG e CHANG, 1994); 26,8% (FIORANELLI *et al.*,

2003); 60,1% (DIAS, 2006); aproximando-se mais dos valores encontrados para girinos: 79,9% (FERREIRA *et al.*, 2003); 72,9% (ROMERO-ARAUCO, 2006). Já a porcentagem de neutrófilos observada para imagos

foi inferior à de rãs adultas para estes autores: 29,9% (WANG e CHANG, 1994) e 24,13% (DIAS, 2006), o que é esperado para o quadro hematológico.

Segundo FIORANELLI *et al.* (2003) e COPPO *et al.* (2005) a concentração de glóbulos brancos e a proporção de linfócitos tendem a diminuir com o avanço da idade em *Rana catesbeiana*, enquanto a porcentagem de neutrófilos tende a aumentar, conforme tem sido constatado em várias espécies de mamíferos em crescimento, incluindo humanos (COPPO, 2003), e concordando com os resultados do presente trabalho quando comparamos com os valores apresentados por outros autores utilizando rãs adultas.

Os resultados deste trabalho diferiram daqueles obtidos por DIAS (2006) que constatou diminuição dos valores absolutos de basófilos em rãs tratadas com probióticos. Os valores de eosinófilos e monócitos foram semelhantes aos encontrados por DIAS (2006) com 1,37 % e 1,1 % respectivamente.

As condições de criação podem influenciar de forma direta na eficiência dos aditivos promotores de crescimento (BORATTO *et al.*, 2004). Práticas adequadas de manejo, como as utilizadas neste experimento, podem levar a resultados que não mostrem efeito significativo desses aditivos sobre o desempenho dos animais. Contudo, quando expostos às situações de desafio imunológico, bem como, provavelmente, outras situações de estresse, os probióticos podem evidenciar sua ação sobre os imagos de rã-touro.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados podemos concluir que o probiótico composto por *Bacillus subtilis* em diferentes doses não exerceu influência sobre o ganho de peso e a sobrevivência dos imagos. As análises imunológicas mostraram que o probiótico apresentou efeito imunoestimulador, mas não influenciou os parâmetros hematológicos dos animais.

REFERÊNCIAS

- BORATTO, A. J.; LOPES, D. C.; OLIVEIRA, R. F. M.; ALBINO, L. F. T.; SÁ, L. M.; OLIVEIRA, G. A. 2004. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de Corte Criados em Ambiente de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*, *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 33(6): 1477-1485.
- CANADELL, J. e GARCIA, I.A. 1992 Introducción a la tecnología probiótica. *Noticeres*, Caracas, 5: 1-8.
- CASILLAS, E. e SMITH, L.S. 1977 Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Fish Biology*, Huntingdon, 10(5): 481-491.
- CASTRO, J. C. 2003 Uso de Aditivos e Probióticos em Rações Animais. In: FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TEIXEIRA, P. C.; FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C. I. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RANICULTURA E II CICLO DE PALESTRA SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34: 12-18.
- COLLIER, H.B. 1944 The standardizations of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, 50: 550-552.
- COPPO, J. A. 2003 El medio interno de la "rana toro" (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). Revisión bibliográfica. *Revista Veterinaria*, Corrientes, 14(1): 25-41.
- COPPO, J.A.; MUSSART, N.B.; FIORANELLI, S.A.; BARBOZA, N.N.; KOZA, G.A. 2005 Variaciones fisiológicas atribuibles al crecimiento, alimentación y temperatura ambiental en sangre de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). *Revista Veterinaria*, Corrientes, 16(2): 74-83.
- COPPOLA, M.M. e GIL-TURNES, C. 2004 Efeito do probiótico na resposta imune *Ciência Rural*, Santa Maria, 34(4): 1297-1303.
- CROSS, M.L. 2002 Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, 34(4): 245-253.
- DIAS, D.C. 2006 *Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro Rana catesbeiana Shaw, 1802*. Jaboticabal. 80p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura da UNESP).
- DIAS, J. L. C. 1992 *Influência da temperatura ambiente sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (Rana catesbeiana Shaw, 1802)* São Paulo, 117p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP).

- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.
- FERREIRA, C.M.; BUENO-GUMARÃES, H.M.; SOARES, S.R.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, P.H.N. 2003 Hematological markers of cooper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, 16(2): 83-88.
- FIORANELLI, S.A.; COPPO, N.B.; COPPO, J.A. 2003 Los glóbulos blancos de *Rana catesbeiana* (Anfíbia: Ranidae) Variación según sexo, edad, peso, crianza, alimentación y época del año. Unuversidad Nacional del Nordeste. Disponível em: <<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.pdf>> Acesso em: 26 mai. 2006.
- FIORANELLI, S.A.; MUSSART, N.B.; COPPO, J.A. 2004 Efeito do sistema de criação, alimentação e mudanças estacionais sobre o peso vivo e valores do hemograma da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*). *Revista Veterinaria*, Corrientes, 15(1): 9-16.
- FONTANELLO, D. e FERREIRA, C.M. 1999 *Ranário climatizado*. São Miguel do Iguçu: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura (ABETRA). 20p. (Manual técnico).
- FULLER, R. 1977 The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, Abingdon, 18: 85-94.
- FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 66: 365-378.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal Clinical of Pathology*, Hagerstown, 56(1): 35-39.
- GUZMÁN, G. A. 1992 Aplicación de Probióticos en la Acuicultura. In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R.; ALFARO, R. M. *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noevo León, México: Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey. p.332-337.
- HARRIS, J.A. 1972 Seasonal variation in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 43(A): 975-989.
- HORTON, J.D. 1994 Amphibians. In: TURNER, R.J. *Immunology: A comparative approach*. England: Jonh Wiley & Sons Ltd. p.102-135.
- KAILASAPATHY, K. e CHIN, J. 2000 Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, Canberra, 78: 80-88.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. 1999 *Handbook of probiotics*. New York: Wiley. 211p.
- LIMA, S.L. e AGOSTINHO, C.A. 1992 *A Tecnologia de Criação de Rãs*. Viçosa: Folha de Viçosa. 168p.
- PALENSKE, N.M. e SAUNDERS, D.K. 2003 Blood viscosity and hematology of American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at low temperature. *Journal of Thermal Biology*. New York, 28: 271-277.
- PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. 1996 Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, São Paulo, 33(1): 15-18.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A. 2004 Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela. p.89-120.
- ROMERO-ARAUCO, L.R. 2006 *Efeito do extrato hitroalcoólico de própolis em girinos de rã-touro (Rana catesbeiana)* Jaboticabal. 102p. (Tese de Doutorado. Centro de Aqüicultura da UNESP).
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, 20: 329-334.
- SILVA, J.R.M.C.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES, J.C.S.; JENSCH-JUNIOR, B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Atlantic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, Berlin, 28(4): 326-328.

- SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L.R; BORGES, J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology*, Scotland, 60: 466-478.
- STÉFANI, M. V. 2001 Alimentação e Nutrição. In: FERREIRA, C.M. I CICLO DE PALESTRA SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 31: 18-20.
- WANG, J.H. e CHANG, M.H. 1994 Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Coa Fisheries*, Taipei, 46: 69-87.
- WINTROBE, M.M. 1934 Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica*, Leipzig, 51: 32-49.
- WIRZ, R.R; FONTANELLO, D.; ARRUDA SOARES, H.; FREITAS, E.A.N.; TEIXEIRA FILHO, A.R. 1992 Ganho de peso de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), criada em gaiolas, com rações de diferentes níveis protéicos, consorciada com larvas de diptera (*Musca domestica*). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 19: 83-88.
- ZAR, J. H. 1996 *Biostatistical Analysis*. 3rd-ed. New Jersey, USA: Prentice-Hall. 662p.
- ZIEMER, C. J. e GIBSON, G. R. 1998 An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, Amsterdam, 8: 473-479.