



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”



CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Biomassa da bactéria *Rubrivivax gelatinosus* proveniente do tratamento de
efluente de piscicultura melhora a saúde dos peixes

Sílvia Umeda Gallani

Médica veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Biomassa da bactéria *Rubrivivax gelatinosus* proveniente do tratamento de
efluente de piscicultura melhora a saúde dos peixes

Sílvia Umeda Gallani
Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Centro
de Aquicultura da Unesp, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Aquicultura

JABOTICABAL – SÃO PAULO
2015

Gallani, Sílvia Umeda

G163 Biomassa de bactéria *Rubrivivax gelatinosus*
b proveniente do tratamento de efluente de piscicultura
melhora a saúde de peixes / Sílvia Umeda Gallani. --
Jaboticabal, 2015
xii, 68 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Centro de Aquicultura, 2015

Orientadora: Fabiana Pilarski

Banca examinadora: Fabiana Garcia, Mônica Serra
Bibliografia

1. Aquicultura. 2. Efluente. 3. Imunoestimulante. 4.
Imunologia. 5. Nutrição. 6. Resíduo. 7. Subproduto. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da Unesp.

CDU 639.3.05

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Biomassa da bactéria *Rubrivivax gelatinosus* proveniente do tratamento de efluente de piscicultura melhora a saúde dos peixes

AUTORA: SÍLVIA UMEDA GALLANI

ORIENTADORA: Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DE PEIXES, CAUNESP, JABOTICABAL-SP



Profa. Dra. MÔNICA SERRA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. FABIANA GARCIA SCALOPPI
APTA, AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DO AGRONEGÓCIO, VOTUPORANGA-SP

Data da realização: 09 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO À MINHA FAMÍLIA PELA EDUCAÇÃO, AMOR E POR FAZEREM DA MINHA VIDA A MAIS FELIZ.

SOU GRATA...

À MINHA ORIENTADORA E AMIGA FABIANA PILARSKI PELOS ENSINAMENTOS E POR TODO O CARINHO E ESTÍMULO DURANTE ESSES ANOS, E À PROF^a ELISA PONSANO POR FAZER PARTE DA CRIAÇÃO DESTE PROJETO.

À MEU NAMORADO E COLEGA GUSTAVO. SEM ELE ESTE TRABALHO NÃO SERIA POSSÍVEL.

AOS COLEGAS DO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, FISIOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS E UNESP DE ARAÇATUBA QUE PARTICIPARAM DO MEU MESTRADO, E PELOS ENSINAMENTOS E MOMENTOS AGRADÁVEIS.

AOS COLEGAS, FUNCIONÁRIOS E PROFESSORES DO CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP (CAUNESP).

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) POR TER CONCEDIDO BOLSA E AUXÍLIO FINANCEIRO PARA ESTE ESTUDO (PROCESSO: 2013/08353-0)

Índice

Índices de Figuras	iii
Índices de Tabelas	iv
Abreviações	v
CAPÍTULO 1	vi
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Revisão Bibliográfica	9
1. Aquicultura e aspectos sanitários.....	9
2. Saúde dos peixe e aditivos alimentares	11
2.1. Aspectos hematológicos (hemograma e leucograma) e bioquímicos.....	11
2.2. Sistema imune e processos oxidativos	13
2.3. Aditivos alimentares.....	19
3. <i>Rubrivivax gelatinosus</i> e biomassa.....	21
4. Uso de biotecnologia para obtenção de subprodutos.....	25
5. Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 2	41
Biomass produced from wastewater improves fish health.....	42
Abstract.....	43
Introduction	44
Material and Methods.....	46
Production of <i>Rubrivivax gelatinosus</i> biomass.....	46
Experiment design and diet production.....	47
Hematological Analysis	48
Biochemical Analysis.....	50
Immunological Analysis	50
Energy Status Analysis.....	50
Results	51
Hematological Analysis	51
Biochemical Analysis.....	51
Immunological Analysis	51
Energy Status Analysis.....	52
Discussion.....	52
References	55
Figure Legends	62
Supporting Information Legends.....	63
Appendices	64

Índices de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mecanismos de resposta imune inata e adquirida (Abbas *et al.*, 2008)..... 15

Figura 2. Camarão alimentado com dieta suplementada com astaxantina (esquerda) e camarão alimentado com dieta controle (direita) (Wade *et al.*, 2009).....21

Figura 3. Efluente industrial de pescado utilizado para o tratamento com *Rubrivivax gelatinosus* (a); cultivo biotecnológico de *R. gelatinosus* em efluente para o tratamento e obtenção de biomassa (b); comparação entre efluente antes (direita) e depois (esquerda) do tratamento com *R. gelatinosus* (c).....22

Figura 4. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*.....23

CAPÍTULO 2

Figure 1. Thrombocytes, neutrophils and lymphocytes cells count of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....64

Figure 2. Glucose and cortisol analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....64

Figure 3. Complement system and burst analyses of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....64

Figure 4. Energy Status of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....65

Índices de Tabelas

CAPÍTULO 2

Table_S1. Hematological and WBC Differential Count Analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/ kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....66

Table_S2. Biochemical, Antioxidant enzyme (SOD and CAT) and cellular membrane damage (LPO) analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/ kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....67

Table_S3. Immunological Analyses- Innate Immune System of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/ kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....68

Table_S4. Energy Status, ALT and AST analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/ kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.....68

Abreviações

CAPÍTULO 1

Hg: Hemoglobina

Ht: Hematócrito

MOS: Mananoligossacarídeo

NK: Natural Killers

RBC: Red Blood Cells

spp.: Espécie

CAPÍTULO 2

g/dL: grams per deciliter

g/Kg: grams per kilogram

h: hour

IL: Interleukins

IU: International Unity

L: Liter

Lh: Liter per hour

m³: cubic meter

μHg: micrometers of mercury

μL: microliter

μm: micrometer

mM: milimolar

mg/Kg: milligram per kilogram

T°C: temperature in Celsius degrees

TNF: Tumor Necrosis Factor

W: Watts

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

**USO DA BIOTECNOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO
IMUNOESTIMULANTE**

Resumo

Esta revisão discorre como a biotecnologia pode ser aplicada no tratamento de efluente de indústria de pescado para obtenção de biomassa e, ainda, como esta biomassa pode ser utilizada na alimentação de peixes. Atualmente, com a intensificação da aquicultura há o surgimento de surtos de doenças parasitárias e bacterianas que devastam economicamente a criação de peixes. Com isso, surgem os problemas relacionados ao uso inconsequente e errôneo de produtos como antimicrobianos e desinfetantes com a finalidade de controlar mortalidades e evitar grandes perdas econômicas. A fim de contornar esse obstáculo do uso indiscriminado de substâncias não registradas para a aquicultura e controlar o surgimento das doenças em peixes, o emprego de imunostimulantes e vacinas têm se destacado como métodos preventivos eficazes e seguros. Algumas substâncias podem atuar como imunostimulante e influenciar as respostas do sistema imune dos peixes e o seu desempenho produtivo. *Rubrivivax gelatinosus* é uma bactéria gram negativa, púrpura fototrófica, anaeróbica e com movimentação por flagelo que despolui efluentes industriais pois utiliza o carbono orgânico como principal fonte de carbono para o seu crescimento, contribuindo assim para a retirada de carbono e nitrogênio da água. Além disso, esta bactéria fornece uma biomassa com elevado valor nutricional, pois contém elevada quantidade de proteínas e carotenóide da série esferoidene, considerado potente imunostimulante devido sua ação antioxidante. O uso desta bactéria otimiza a cadeia produtiva de pescados, renovando a água poluída de efluente, e ainda, nos proporciona através da biotecnologia empregada, uma massa biológica imunostimulante para uso na própria aquicultura.

Palavras-chave: aquicultura, efluente, imunostimulante, imunologia, nutrição, resíduo, subproduto.

Abstract

This review clarifies how biotechnology may be applied on treatment of fish industry effluent to obtain biomass, and also, how this biomass can be applied as a fish food supplement. Currently, with the intensification of aquaculture has been occurrence of parasitic and bacterial outbreaks diseases that economically devastate the fish farming. Thus, arising problems related to inconsistent and incorrectly use of products such as antimicrobials and disinfectants applied in order to control mortality and avoid huge economic losses. To circumvent these obstacles of indiscriminate use of unregistered substances and in order to control the emergence of fish diseases, the use of immunostimulants and vaccines has been shown to be effective as prevention methods besides safety. Some substances can act as an immunostimulant and influence the responses of the fish immune system and its productive performance. *Rubrivivax gelatinosus* is a gram negative bacterium, purple phototrophic, anaerobic with movement by flagellum which depollute industrial effluents because it uses organic carbon as the main carbon source for growth, thereby, contributing to the removal of carbon and nitrogen from the water. Furthermore, this bacterium provides a biomass with a high nutritional value because it contains a high amount of protein and carotenoid of spheroidene class, considered potent immunostimulant due to its antioxidant action. The use of this bacterium optimizes the fish supply chain, renewing the polluted wastewater, and also gives us by the biotechnology employed, a biological mass immunostimulatory for use in aquaculture itself.

Keywords: aquaculture, by-product, effluent, immunostimulant, immunology, nutrition, waste.

Revisão Bibliográfica

1. Aquicultura e aspectos sanitários

Em 2012, a produção mundial de pescado ultrapassou a produção de carne bovina (Earth Policy Institute, 2013) e a crescente demanda por alimentos continuará nos próximos anos, assim como a decorrente concorrência por terra, água e energia, consequentes do aumento populacional mundial. Assim, a superexploração da pesca vai afetar a nossa capacidade de produzir alimentos, assim como será requerida, urgentemente, a redução do impacto ambiental do sistema de produção (Godfray et al., 2010).

Para suprir essa demanda, a intensificação da aquicultura vem sendo constatada, ano após ano, na qual se utilizam altas taxas de arraçoamento e elevada densidade animal em espaço cada vez menores. Nesta conjuntura, quando consideramos o aspecto sanitário aquícola, é alarmante o aumento de doenças associadas com a alta densidade populacional e elevada carga de matéria orgânica presente na água decorrente dessa intensificação produtiva. Logo, surgem as situações de desequilíbrio ecológico (hospedeiro:ambiente:parasito) responsáveis pelo aparecimento de doenças dentro do sistema de criação. Normalmente, estas enfermidades se iniciam através de infestações parasitárias, classificadas como doenças primárias, as quais podem favorecer o surgimento de lesões oportunistas como as bacterioses. Já as enfermidades secundárias oportunistas (bacterianas ou fúngicas), que em sua maioria compõem a microbiota aquática e flora intestinal de animais saudáveis, têm um potencial maior de causar surtos de mortalidade quando o ambiente lhes é favorável e os animais estão debilitados (Abd El-Galil e Aboelhadid, 2012).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) está entre as espécies nativas com maior potencial para a aquicultura, se destacando com mais de trinta espécies e representando

11.042 toneladas de produção continental da espécie (a 6ª maior do país) (Dados MPA 2013, referente ao ano de 2010). Ainda, se destaca entre as espécies mais produzidas pelo fácil manejo (Urbinati *et al.*, 2005). Esses peixes redondos são rústicos e apresentam boas características produtivas (hábito alimentar omnívoro e alto crescimento) e de mercado (carne apreciada) (Castagnolli, 1995). Seu método de criação normalmente utiliza viveiros escavados, com água morna (Urbinati *et al.*, 2005) e com pouca ou nenhuma renovação de água, em sistemas semi-intensivo ou intensivo, gerando um ambiente propício para instalação de enfermidades. Apesar da crescente intensificação na criação desta espécie, os cuidados sanitários não têm sido considerados por grande parte dos produtores.

A FAO lista *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* e *Enterococcus* sp. como os principais agentes causadores de doenças bacterianas em peixes, responsáveis por perdas econômicas significativas para os produtores. Todas estas bactérias também afetam o pacu, mas os gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium* são os mais frequentes (Sebastião, 2015), sendo responsáveis por surtos de mortalidades. Isso pode estar relacionado, diretamente, ao ambiente de criação, o qual favorece o desenvolvimento dos patógenos e/ou, indiretamente, a saúde do peixe, seja pelo adensamento, má nutrição, má qualidade de água ou falhas de manejo (Pickering e Pottinger, 1989).

Como nessas culturas intensivas os agentes infecciosos são facilmente transmitidos entre indivíduos (Somerset *et al.*, 2005), os surtos se tornam fatores agravantes (Dügenci *et al.*, 2003). Contudo, não há possibilidade de escolha de protocolos específicos para cada doença, principalmente, devido à falta de produtos registrados para o tratamento em peixes (no Brasil há apenas dois antimicrobianos de

amplo espectro permitidos pela legislação: florfenicol e oxitetraciclina) (Brasil, 2013; CPVS-SINDAN, 2013).

Para o controle e tratamento dessas enfermidades são utilizados a quimioterapia e antimicrobianos (Abasali e Mohamed, 2010) e estas práticas têm sido criticadas devido aos efeitos negativos do seu uso, como acúmulo de resíduos tanto no filé (Ansari *et al.*, 2014) quanto no ambiente (Hu *et al.*, 2014) e também por causar resistência bacteriana (Cabello, 2006).

Todas estas limitações motivam o desenvolvimento de estudos sobre as práticas preventivas (Vaseeharan e Thaya, 2014), principalmente, através do uso de aditivos alimentares para manutenção da saúde do lote durante todo o ciclo produtivo.

2. Saúde dos peixe e aditivos alimentares

2.1. Aspectos hematológicos (hemograma e leucograma) e bioquímicos

Animais saudáveis mantêm uma condição de homeostase, regulando suas respostas fisiológicas de acordo com as alterações ambientais a que é submetido. No entanto, mudanças nos valores de normalidade em análises bioquímicas, imunológicas e hematológicas podem ser constatadas em fator das variações ambientais como salinidade, temperatura, carga de matéria orgânica dissolvida, quantidade de oxigênio, entre outros (Grant, 2015). Em algumas condições, pode-se observar valores elevados de hematócrito, hemoglobina e RBC (eritrócitos), assim como HCM (hemoglobina corpuscular média), VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) (Yavuzcan-Yıldız e Kırkavgaç-Uzbilek, 2001). Contudo, na produção de peixes, geralmente, é mais comum encontrarmos alterações relacionadas à presença de anemia (diminuição de valores de Ht, Hg, RBC que indicam

a presença de anemia e medidas associadas de VCM, HCM e CHCM, as quais indicam os tipos de anemia) (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

As principais células que participam do sistema imunológico são os leucócitos, responsáveis pela destruição dos antígenos. O morfologia dos leucócitos, assim como a presença deles podem variar, substancialmente, entre as espécies de peixes. Os monócitos são os maiores leucócitos e considerados os principais fagócitos em peixes (Tavares Dias e Moraes, 2004). Já os linfócitos (leucócito que participa da resposta imune humoral e celular) são os menores e mais abundantes e responsáveis pelo reconhecimento do antígeno (Ranzani-Paiva, 2007; Tizard, 2013). Os leucócitos LG-PAS, ou leucócito granular PAS- positivo também é conhecido como célula granulocítica especial (CGE), e até o momento, não possui função elucidada, mas sua migração pode ser verificada em focos inflamatórios (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). Os neutrófilos são células granulocíticas consideradas como os principais leucócitos responsáveis pela defesa do organismo em infecções bacterianas (Tizard, 2013). Os eosinófilos são leucócitos bem discutidos por pesquisadores, cuja função não está bem esclarecida, mas já foi relacionada à presença de infestação parasitária (Martins *et al.*, 2004). Os basófilos são os leucócitos mais dificilmente encontrados no sangue, cuja função também não está elucidada (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

Com relação ao leucograma de animais imunoestimulados pela dieta, pode-se observar granulocitose (aumento de células granulocíticas) de monócitos e neutrófilos além de linfopenia (diminuição de linfócitos), já que alimentos imunoestimulantes podem ser considerados também como agentes estressores (Labh e Shakya, 2013). Para a maioria das espécies de peixes, este quadro leucocitário é muito parecido com o leucograma de estresse, o qual é manifestado por linfopenia e granulocitose relativa,

contudo, os dois podem ser diferenciados pela contagem total de leucócitos (leucopenia em situações de estresse) (Clauss *et al.*, 2008).

Recentemente, os trombócitos, que são células sanguíneas relacionadas com a coagulação, também foram apontados como importante células fagocitárias (Nagasawa *et al.*, 2014), assim, valores altos podem ser verificados em quadros de imunoestimulação.

Distúrbios na homeostase também podem afetar os valores bioquímicos. Em animais sob condições de estresse, o cortisol pode aumentar (Yavuzcan-Yıldız e Kırkavgaç-Uzbilek, 2001), assim como os valores de proteínas e albuminas. Mas estas podem também estar aumentadas em animais imunoestimulados (Labh e Shakya, 2013). Os níveis de glicose são relacionados à fonte de obtenção energética, e considerados fatores importantes relacionados ao metabolismo dos peixes (Hemre *et al.*, 2002). Valores de alanina transferase (ALT) e aspartato transaminase (AST) indicam o estado de saúde hepático. Em peixes, o aumento destes valores pode indicar, principalmente, sobrecarga hepática por alimentação ou degeneração dos hepatócitos (Sheikhzadeh *et al.*, 2012).

No geral, a avaliação da saúde de peixes é complexa de ser realizada através destes exames, uma vez que valores de referência variam muito entre espécies, e até entre animais da mesma espécie, mas que se encontram em ambientes diferentes, ou apresentam diferença de idade e sexo (Cameron, 1970).

2.2. Sistema imune e processos oxidativos

O sistema imunitário dos peixes é considerado primitivo em comparação ao dos mamíferos, de modo que a eficácia das vacinas nestes animais é discutida (Somerset *et al.*, 2005). Uma vez que os imunoestimulantes são capazes de contornar estes

inconvenientes e de reforçar o sistema imune do animal contra mais de um tipo de agente patogênico (Ardó *et al.*, 2008), a sua aplicação se torna cada vez mais rotineira, até mesmo como aliado aos protocolos de vacinações.

O sistema imune, basicamente, é dividido em duas partes: imunidade inata, que é não específica, e a adquirida, que é aquela que o organismo adquire após o contato com o patógeno. A imunidade inata se resume ao processo inicial de combate ao antígeno, sendo a primeira linha de defesa. É compreendida por defesas celulares e bioquímicas, que já existiam antes da infecção. Compreendem esta linha de defesa as barreiras físicas e químicas como as escamas, muco e as moléculas antibacterianas nestas superfícies, como a lisozima presente no muco. As células fagocitárias e células natural killers (NK) também compõem essa linha de defesa, assim como frações protéicas do sangue como o sistema complemento e mediadores inflamatórios e citocinas, responsáveis por coordenar e regular as respostas inatas. Complementando o sistema imune inato, há o sistema imune adquirido, que aumenta a intensidade da resposta de acordo com exposições prévias ao antígeno. Esta linha de defesa se caracteriza pela memória imunológica que se desenvolve após a exposição do organismo frente ao microorganismo invasor e também pela especificidade, já que possui capacidade de diferenciar microrganismos extremamente semelhantes. Neste sistema, ao invés de células fagocíticas, NK e barreiras físicas, o sistema é composto por barreiras celulares e químicas de linfócitos (imunidade celular) e anticorpos (imunidade humoral) (Abbas *et al.*, 2008; Tizard, 2013)(Figura 1).

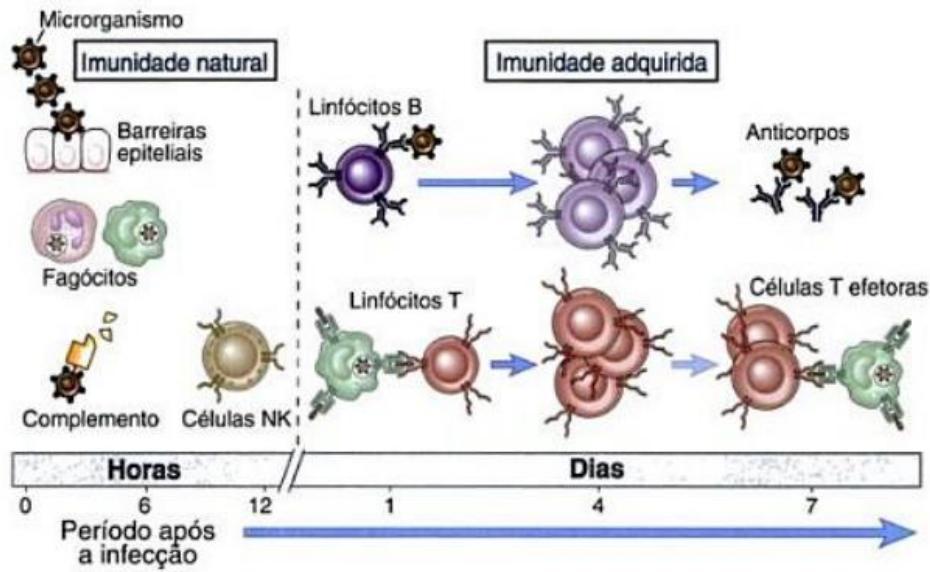


Figura 1. Mecanismos de resposta imune inata e adquirida (Abbas et al., 2008).

O sistema imune inato é fundamental nos peixes (Magnadóttir, 2006) e a lisozima, assim como as enzimas antioxidantes, são consideradas moléculas antibacterianas essenciais, que podem atuar direta ou indiretamente sobre os componentes de células da parede bacteriana, resultando em lise (Tort *et al.*, 2003). A lisozima é uma enzima produzida por macrófagos e neutrófilos granulocíticos, capaz de digerir a camada peptidoglicana da parede celular bacteriana de patógenos altamente virulentos, como a *A. hydrophila* (Ellis, 1999; Muiswinkel e Nakao, 2014).

Ainda com relação à imunidade inata, os neutrófilos e macrófagos são as principais células fagocitárias (Secombes e Fletcher, 1992) e este processo de defesa aeróbico é denominado atividade respiratória dos leucócitos, que como o nome sugere, necessita de oxigênio, gerando moléculas de oxigênio desemparelhadas (radicais livres) (Dügenci *et al.*, 2003). Estas células fagocitam os antígenos através da liberação de ROS (Espécies Reativas em Oxigênio) e NO (Óxido Nítrico), e este processo de fagocitose não é considerado apenas uma etapa de atividade do sistema imune inato, mas um estepe para a resposta do sistema imune adquirido, já que na resposta

imunológica há uma grande cadeia de cooperação entre o sistema imune inato (células fagocíticas) e sistema imune adquirido (imunoglobulinas).

Com relação ao sistema complemento, especular qual via (alternativa, clássica ou lectina) deste sistema é mais ativa em peixes é tentador (Muiswinkel e Nakao, 2014). Yano (1996) sugeriu que a via alternativa é mais desenvolvida em peixes do que em mamíferos. Mas, assim como em diversos fatores fisiológicos, este também pode ser afetado por fatores ambientais e fatores intrínsecos como idade ou condição do organismo (Muiswinkel e Nakao, 2014). Os teleósteos possuem todos os fatores do sistema complemento presentes em mamíferos e, ainda, todas as vias deste sistema são operantes (Boshra *et al.*, 2006; Nakao *et al.*, 2011). Sabe-se que a via alternativa do sistema complemento é a responsável pela lise dos eritrócitos (RBC) de uma série de animais, enquanto em humanos essa atividade é restrita para RBC de coelhos (Boshra *et al.*, 2006). Esse fato sugere que esta via possui atividade mais ampla de reconhecimento de superfície de antígenos do que em mamíferos. Assim, o sistema complemento possui mecanismo fundamental no reconhecimento antigênico para a opsonização e fagocitose. Convenientemente, a palavra opson deriva do grego, e significa molho, e o processo de opsonização é o mecanismo em que opsoninas se ligam à superfície antigênica, facilitando a fagocitose, tornando-a mais atrativa (Abbas *et al.*, 2008). Além disso, o sistema complemento também pode acarretar na lise bacteriana através da formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC), que forma um buraco na membrana bacteriana, levando ao influxo de água e íons, e consequente desequilíbrio osmótico, e então, causando lise celular. A degranulação de mastócitos e quimiotaxia de neutrófilos são eventos verificados no aumento da inflamação na cascata protéica do sistema complemento. Outras atividades como regulação da imunidade, angiogênese, remoção

de células apoptóticas e coagulação sanguínea também são decorrentes da ativação deste sistema (Tizard, 2013).

Deste modo, a estimulação do sistema imune inato é um dos mais importantes mecanismos de defesa contra patógenos (Steck e Grassl, 2014) e em animais imunoestimulados, os leucócitos podem produzir mais ROS, caso haja aumento da fagocitose (Liu *et al.*, 2014). Quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante do organismo, ocorrem danos celulares e até mesmo a morte de células saudáveis, consequência da produção excessiva de ROS no estresse oxidativo (Betteridge, 2000). Assim, quando os microrganismos entram no corpo, estes são detectados pelos receptores de reconhecimento de padrões e defesa inata, e, subsequentemente, é desencadeada a produção de ROS para combate ao antígeno. Contudo, o metabolismo produz espécies reativas de oxigênio, que são essenciais em diversas funções fisiológicas, tais como fagocitose de antígenos (Lademann *et al.*, 2014) e de acordo com Liu *et al.*, 2014, com o uso de imunoestimulante, pode haver um aumento de leucócito fagocítico, liberando maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) no processo denominado queima respiratória (Yang *et al.*, 2014). De um modo mais detalhado, neste processo, os leucócitos utilizam NADPH-oxidase para reduzir o oxigênio em superóxido (O_2^-) e em seguida peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 combina com o cloreto (Cl^-) para sintetizar hipoclorito, cuja função é destruir o antígeno. Mas, quando a produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^- ou H_2O_2) excede a atividade antioxidante do organismo, ocorre um processo denominado "estresse oxidativo" (Betteridge, 2000).

A fim de combater ou amenizar os danos causados por este processo, algumas enzimas antioxidantes são produzidas pelos organismos, como a superóxido-dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Liu *et al.*, 2014). Contudo, apenas o aumento destas e

de outras enzimas também ligadas à queima respiratória não indicam que há um estresse oxidativo, já que estas enzimas antioxidantes podem se apresentar em altos valores com a resposta fisiológica do indivíduo adaptada àquela situação. Assim, para a confirmação de dano celular causado pelo estresse oxidativo é realizada a avaliação de peroxidação lipídica, utilizando o método FOX, o qual fornece dados relacionados aos danos na membrana celular (método direto), diferente do método TBARS, que proporciona dados relacionados com o subproduto libertado pelos danos celulares (método indireto). Neste aspecto, quando as enzimas antioxidantes não conseguem equilibrar a situação de produção e eliminação de ROS, os imunoestimulantes antioxidantes podem ajudar, atuando diretamente como eliminadores de radicais livres (Jørgensen e Skibsted, 1993).

A estimulação do sistema imune inato dos peixes através da administração de antioxidantes na dieta (por exemplo, carotenóides) é, especialmente, importante para ajudar no combate aos efeitos do estresse, assim, o fornecimento de dietas com suplemento antioxidante pode se tornar um fator limitante no desenvolvimento de imunopatologias (Babin *et al.*, 2014). Ainda, o uso de imunoestimulantes pode melhorar diversos parâmetros, como a atividade respiratória dos leucócitos, os processos de fagocitose e a quantidade de espécies reativas de oxigênio (Samad *et al.*, 2013), gerando maior resistência frente ao estresse oxidativo causado pelas infecções, como por exemplo as causadas por *A. hydrophila* (Awad e Austin, 2010). E ainda, os compostos antioxidantes, como o carotenóide, são um dos mais reconhecidos e têm sido descritos como neutralizantes de radicais livres e potentes imunoestimulantes (Schloss e Vitetta, 2014).

2.3. Aditivos alimentares

Para muitos pesquisadores, a vacina é considerada o principal método profilático na aquicultura (Gudmundsdóttir e Björnsdóttir, 2007). Todavia, as vacinas são projetadas, principalmente, para espécies de elevado valor comercial, como salmão e truta (Brudeseth *et al.*, 2013) e são específicas para cada patógeno. Assim, quando se trata de método profilático, a aplicação de alimentos imunoestimulantes no setor produtivo se destaca, não só pela facilidade de aplicação, mas pela grande vantagem sobre as vacinas de prevenir contra mais de uma enfermidade.

Os aditivos alimentares têm sido utilizados com a finalidade de estimular o sistema imune de peixes. Estas substâncias podem ser agrupadas como agentes químicos, preparos bacterianos, polissacarídeos, extratos de animais ou plantas, fatores nutricionais e citocinas (Sakai, 1999). Ainda, um imunoestimulante é um químico, droga ou estressor que aumenta a resposta imune inata (não-específica) através da interação direta com células do sistema, ativando-as (Labh e Shakya, 2013). Desta forma, o peixe fica protegido contra amplo espectro de patógenos, podendo agir, diretamente, na ativação de receptores relacionados ao sistema imune inato e/ou acionando os genes de ativação intracelulares específicos, resultando em produção de moléculas antimicrobianas (Chakraborty *et al.*, 2013). Assim, a imunoestimulação parece ser o melhor método de prevenção de doenças (Ardó *et al.*, 2008) e, o melhor método de administração de substâncias imunoestimulantes para os peixes de todos os tamanhos é por via oral (Selvaraj *et al.*, 2005). Em aquicultura, entre os imunoestimulantes, destacam-se o uso de vitamina C, probióticos e prebióticos além dos fitoterápicos e carotenóides (Newaj-Fyzul e Austin, 2014).

Dentre eles, os alimentos com carotenóides na composição vêm ganhando destaque pelo elevado potencial de aplicação, já que são pigmentos que apresentam, ao

menos, seis funções já comprovadas: é o mais potente precursor da vitamina A (Harrison, 2012); é considerado um corante natural; (Žilić *et al.*, 2012), e precursor de compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos alimentos (Vogel *et al.*, 2010), possui elevada atividade antioxidante (Ngo *et al.*, 2012.), é protetor contra a peroxidação lipídica (Alshatwi *et al.*, 2011) e ainda é capaz de prevenir certos tipos de câncer (Tanaka *et al.*, 2012).

Tradicionalmente adicionados como pigmentos alimentares, os carotenóides também são conhecidos por desempenharem funções essenciais em quase todos os sistemas biológicos (Amar, 2012). Ainda, mostram grande capacidade em aliviar os sintomas de muitas doenças crônicas e degenerativas em humanos (Maiani *et al.*, 2009), além de melhorar a resposta imune em animais de criação e animais de estimação (Kim *et al.*, 2000). Os carotenóides são imunoestimulantes caros, por isso eles são muito usados para humanos, mas não tanto na piscicultura. São bastante utilizados em peixes ornamentais (Ho *et al.*, 2013), trutas (Anderson *et al.*, 2014), salmões (Ottestad *et al.*, 2011) e camarões (Fanning *et al.*, 2014) (Figura 3), visando, principalmente, a cor vermelho-alaranjado e não para outros fins de produção como a prevenção de doenças.



Figura 2. Camarão alimentado com dieta suplementada com astaxantina (esquerda) e camarão alimentado com dieta controle (direita) (Wade *et al.*, 2009).

Os produtos que contêm carotenóides apresentam efeitos positivos sobre os parâmetros de produção de peixes (Kalinowski *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2011; Güroy *et al.*, 2012) e camarões (Supammataya *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2009). Ainda, a utilização dos aditivos alimentares com carotenóide aumentam a resistência dos organismos aquáticos em situações de estresse (Supammataya *et al.*, 2005; Angeles *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2011), e influenciam positivamente os parâmetros imunológicos (Supammataya *et al.*, 2005; Angeles *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2011). Assim, os produtos que contêm carotenóides não podem ser considerados apenas como um grupo de pigmentos, mas como substâncias com propriedades muito promissoras para a saúde dos animais.

3. *Rubrivivax gelatinosus* e biomassa

Rubrivivax gelatinosus pertence ao maior filo de bactérias (Proteobactérias). Informalmente, este grupo é composto pelo grupo das bactérias roxas e seus familiares (Woese, 1987). Essas bactérias podem ser encontradas na natureza em diversos

ambientes como campos, tanques, rios, lagos e oceanos (Sasaki *et al.*, 1998). *R. gelatinosus* é muito versátil, com vários modos de crescimento e metabolismo energético (Wawrousek *et al.*, 2014). Assim, pode ser classificada como bactéria fotossintética ou fotoheterotrófica com capacidade de realizar fotossíntese em ambientes sem oxigênio, através do uso de elétrons derivados dos ácidos orgânicos, e obtenção de energia da luz solar (Hu *et al.*, 2012). Porém, também pode realizar respiração aeróbica usando ácidos orgânicos (Maness *et al.*, 2002) e fixação de N₂ para suporte de seu crescimento celular (Tang *et al.*, 2011).

Como seu metabolismo é favorável à fixação do nitrogênio e carbono (Nagashima *et al.*, 2012), além de ser capaz de consumir diversas fontes de carbono e nitrogênio, reduzindo o nitrito (NO₂⁻) para nitrogênio gasoso (N₂) ela é utilizada como fator de tratamento de efluentes (Figura 4) e obtenção de biomassa. Seu metabolismo também acarreta na formação de CO₂, H₂O como subprodutos (Mériada *et al.*, 2004; Nagashima *et al.*, 2012).



Figura 3. Efluente industrial de pescado utilizado para o tratamento com *Rubrivivax gelatinosus* (a); cultivo biotecnológico de *R. gelatinosus* em efluente para o tratamento e obtenção de biomassa (b); comparação entre efluente antes (direita) e depois (esquerda) do tratamento com *R. gelatinosus* (c).

No caso do emprego de *R. gelatinosus*, a biomassa gerada neste processo se caracteriza pela elevada quantidade de proteínas e presença de carotenóides (Ponsano *et al.*, 2003; Santo *et al.*, 2013). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2015) pode ser considerada biomassa todo recurso renovável que provêm de matéria orgânica, de origem vegetal ou animal. E este termo é mais frequentemente utilizado quando a matéria orgânica pode ser convertida em energia (Figura 5).

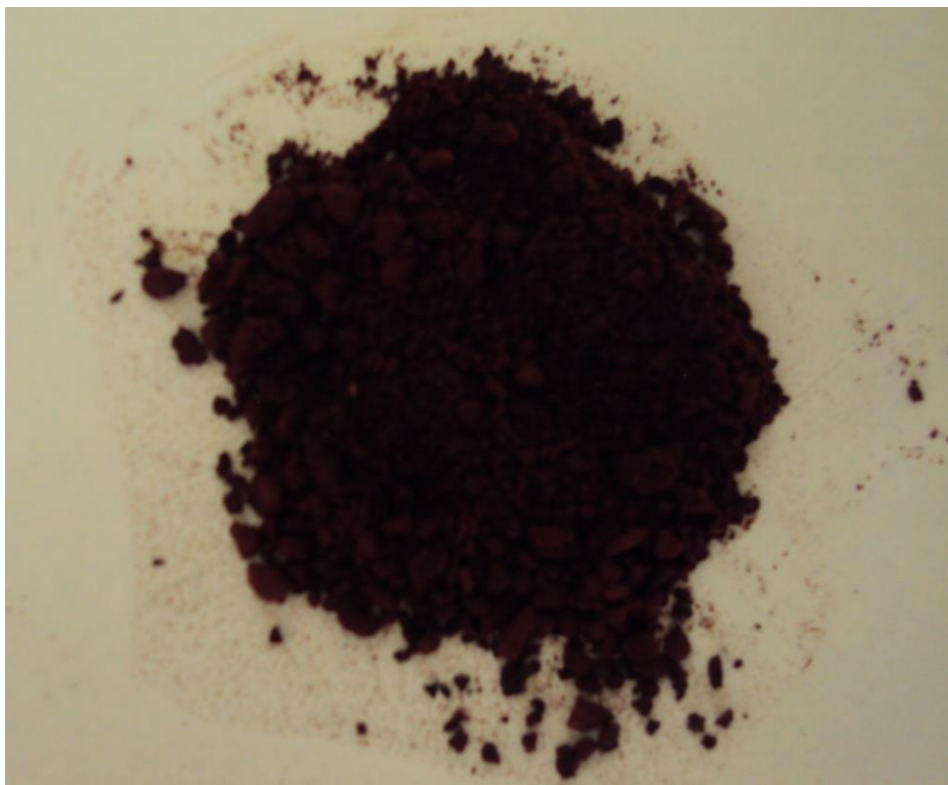


Figura 4. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*.

Logo, o termo biomassa foi proposto porque *R. gelatinosus* é fonte biológica capaz de converter monóxido de carbono (CO) e água (H₂O) em dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂), podendo ser utilizada como combustível celular produtora de gás, gerando eletricidade através da alta combustão dos gases produzidos (Mérida *et al.*, 2004), e assim, outro grande potencial dessa bactéria é a produção de combustível

verde, já que o hidrogênio é uma fonte de energia renovável promissora, que tem gerado grande enfoque nas pesquisas científicas (Maness et al., 2002).

Atualmente, *R. gelatinosus* é considerado um microorganismo modelo para diversos estudos (Wawrousek et al., 2014). Mesmo assim, ainda pouco se sabe a respeito da fisiologia completa desta bactéria, e todo o seu potencial de aplicação. Com o avanço e popularização dos estudos genéticos, foi possível estabelecer características imprescindíveis como a capacidade de síntese de carotenóides pela bactéria, assim como a composição dos pigmentos da biomassa (Nagashima et al., 2012). Diversos estudos enfatizam o uso da biomassa contendo carotenóide (Chaumont e Thépenier, 1995; Reynders et al., 1996) e *R. gelatinosus* é uma bactéria que possui genes envolvidos com síntese destes pigmentos (Hu et al., 2012).

A partir da caracterização genética, foi constatado que os pigmentos fotossintéticos são a bacterioclorofila a e os carotenóides (Willems et al., 1991) e ainda, que os carotenoides presentes nesta biomassa são da série esferoidene (esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina) (Steiger et al., 2000), sendo, recentemente, alguns destes identificados como licopeno e neurosporeno (Nagashima et al., 2012). O licopeno é responsável pela coloração avermelhada de diversos alimentos como a melancia e tomate, já o neurosporeno é considerado um intermediário na biossíntese do licopeno e diversos outros carotenóides (Scolnik et al., 1980). Estes pigmentos são responsáveis pela coloração vermelho-púrpura do cultivo de *R. gelatinosus* (Ponsano et al., 2002). Contudo, as características mais apreciadas desta biomassa são os altos valores protéicos (mais de 52%) e presença de carotenóide (Santo et al., 2013), gerando grande potencial a ser aplicado não só em estudos ambientalistas mas como em estudos de animais de produção.

4. Uso de biotecnologia para obtenção de subprodutos

A aquicultura vem sendo considerada como uma grande promessa para suprir a lacuna existente entre a captura pesqueira mundial e a demanda por pescados, entretanto, o uso excessivo dos recursos naturais e os impactos sócios ambientais negativos causados pela aquicultura precisam ser considerados (Boyd *et al.*, 2006). Para contornar esta problemática, nos últimos anos têm se dado destaque ao emprego de artifícios biotecnológicos, os quais nos permitem a aplicação da engenharia biológica com o intuito de usufruir recursos renováveis degradados como a água, otimizando sua utilização e ambicionando a extração de subprodutos rentáveis resultante de fontes metabólicas destes microorganismos (Kouzuma e Watanabe, 2014).

Basicamente, com o uso de microorganismos específicos podemos utilizar a biotecnologia para obtenção destas biomassas bacterianas como subprodutos metabólicos. Essas bactérias possuem capacidade de reduzir a carga poluente ambiental através do metabolismo de alguns compostos químicos como nitrogênio e carbono (Nagashima *et al.*, 2012). Ainda, estas bactérias podem crescer em ambientes com meios específicos, como por exemplo em aquários com efluente poluído, e assim, possibilita a separação deste composto em duas partes principais: água limpa e biomassa bacteriana. Isso é possível devido à aplicação do processo de microfiltração, que permite a separação da bactéria e outros compostos (os quais são retidos pela membrana do filtro) da molécula de água (que atravessa esta membrana) (Ponsano *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2013; Santo *et al.*, 2013).

O uso deste tipo de tecnologia para obtenção de biomassa é recente, e ainda, de acordo com Bernrdes *et al.* (2003), a utilização da biomassa como fonte para geração de energia será mais aplicável no futuro. Além disso, podemos citar dois principais fatores limitantes para a utilização de biomassa: falta de disponibilidade de áreas de cultivo e

falta de rendimento financeiro. Até o momento, as expectativas sobre a disponibilidade de fontes de biomassa variam substancialmente entre os estudos, contudo, a combinação do uso destas biomassas com novas abordagens para o bioprocessamento seria uma boa oportunidade para otimização de fontes degradadas (McLaren, 2005).

Neste contexto, os resíduos sólidos da indústria de pescado têm sido explorados para obter apenas alguns subprodutos: farinha de peixe (Jayathilakan *et al.*, 2012), óleo de peixe (Yahyaee *et al.*, 2013), silagem (Al-Abri *et al.*, 2014) e compostagem (Eggen e Vethe, 2001). No entanto, os efluentes (resíduos líquidos) são gerados pelas indústrias de pescado em grande escala, e não têm utilidade, com exceção apenas como finalidade para a irrigação agrícola (El-Kady e Suloma, 2013).

Na área da aquicultura poucos estudos foram realizados com bactérias fotoheterotróficas como *Rhodobacter sphaeroidesin*, capaz de remover fósforo da criação de ostras (Takeno *et al.*, 1999; Zilles *et al.*, 2002) e usada como redutora de poluentes da indústria de sardinha através da aplicação de biotecnologia com *Rhodovulum sulfidophilum* (Azad *et al.*, 2004), mas a biomassa é bastante estudada na área de microalgas, como *Haematococcus pluvialis* que produz matéria seca de astaxantina (carotenóide) quando se encontra em ambiente com alta intensidade luminosa e excesso de nitrogênio (Derner *et al.*, 2006). Uma das informações mais valiosas relacionadas às culturas de bactérias fotoheterotróficas como *Rubrivivax gelatinosus* (Ponsano *et al.*, 2002), *Rhodopseudomonas palustris* (Carlozzi e Sacchi, 2001) e *Rhodospirillum rubrum* (Gu *et al.*, 2008) é que elas foram estudadas com êxito na produção biotecnológica de biomassa, capazes de utilizar fontes com excessiva carga de matéria orgânica e assim sintetizar carotenóide, pigmento que os animais não são capazes de sintetizar. Ainda, essas três bactérias são consideradas as fontes promissoras produtoras de hidrogênio futuramente (Paterek, 2005).

Dessa forma, com a aplicação de biotecnologia, podemos aproveitar o dinâmico metabolismo da bactéria *Rubrivivax gelatinosus*. Grande atenção têm sido direcionada ao potencial desta bactéria ser capaz de produzir o combustível ideal (H₂), no qual não produz gases responsáveis pelo efeito estufa (Li e Fang, 2008). Outra característica apreciada que torna esta bactéria muito atrativa para realização de estudos se baseia na sua capacidade de acumular grandes quantidades de polihidroxicanoatos, para a geração de bioplásticos (Maness *et al.*, 2012). Contudo, a escassez de estudos sobre o uso da biomassa sólida co-produzida por esta bactéria nos mostra uma área com grande potencial ainda pouco explorada. E é com a produção desta biomassa que esta bactéria se destaca na limpeza de efluentes, fornecendo uma solução para o uso de efluentes industriais degradados e sem utilidade (Ponsano *et al.*, 2008). Podemos ainda reforçar o potencial imunestimulante desta biomassa, já que é caracterizada pela elevada taxa de proteínas, presença de minerais e carotenóides (Santo *et al.*, 2013).

5. Referências Bibliográficas

- ABASALI, H.; MOHAMAD, S. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. **Agricultural Journal**, v. 5, n. 3, p. 163-172, 2010.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier Brasil, 2008.
- ABD EL-GALIL, M. A. A.; ABOELHADID, S. M. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 57-63, 2012.

AL-ABRI, A. S., et al. Processing and evaluation of nutritive value of fish silage for feeding Omani sheep. **Journal of Applied Animal Research**, n. ahead-of-print, p. 1-8, 2014.

ALSHATWI, A. A. Beneficiary Antilipoperoxidative Effect Of Lycopene On H₂O₂-Supplemented Oxidative Stressed Rats—A Dose-Dependent Study. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 2, p. 149-158, 2012.

AZAD, S. A., et al. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 1, p. 13-18, 2004.

AMAR, E. C., et al. Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids. **Aquaculture**, v. 330, p. 148-155, 2012.

ANDERSON, C., et al. Carotenoid-based coloration is associated with predation risk, competition, and breeding status in female convict cichlids (*Amatitlania siquia*) under field conditions. **Environmental Biology of Fishes**, p. 1-9, 2014.

ANGELES JR, I. P.; CHIEN, Y. H.; YAMBOT, A. V. Effect of injected astaxanthin on survival, antioxidant capacity, and immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) challenged with *Lactococcus garvieae*. **Journal of Shellfish Research**, 28(4), 931-937, 2009.

ANSARI, M.; RAISSY, M.; RAHIMI, E. Determination of florfenicol residue in rainbow trout muscles by HPLC in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 1, p. 61-62, 2014.

ARDÓ, L., et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 275, n. 1, p. 26-33, 2008.

AWAD, E.; AUSTIN, B. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of fish diseases**, v. 33, n. 5, p. 413-420, 2010.

BABIN, A., et al. Limiting immunopathology: interaction between carotenoids and enzymatic antioxidant defenses. **Developmental & Comparative Immunology**, 2014.

Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2): 3-8, 2000.

BERNDES, G., et al. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 1, p. 1-28, 2003.

BRASIL, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 11 de 22 de maio de 2012. Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2012. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RELVIG_042013.pdf Acesso em: 20 dez.2014.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

BOYD, C. E. B., et al. Best management practices for responsible aquaculture. USAID: **Aquaculture Collaborative Research Support Program**, 2008. 47p., 2008.

BRUDESETH, B. E., et al. Status and future perspectives of vaccines for industrialized fin-fish farming. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 6, p. 1759-1768, 2013.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

- CAMERON, J. N. The influence of environmental variables on the hematology of pinfish (*Lagodon rhomboides*) and striped mullet (*Mugil cephalus*). **Comparative biochemistry and physiology**, v. 32, n. 2, p. 175-192, 1970.
- CARLOZZI, P.; SACCHI, A. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 239-249, 2001.
- CASTAGNOLLI, N. Status of aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v. 26, n. 4, p. 35-39, 1995.
- CHAKRABORTY, S. B.; HORN, P.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2014.
- CHAUMONT, D.; THÉPENIER, C. Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. **Journal of applied phycology**, 7(6), 529-537, 1995.
- CLAUSS, T. M., et al. Hematologic disorders of fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008.
- CPVS-SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/index.html> Acesso em dez.2014.
- DERNER, R. B., et al. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- DÜGENCI, S. K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 99-106, 2003.

EARTH POLICY INSTITUTE (2013) Farmed Fish Production Overtakes Beef. Disponível em: <http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114> Acesso em: 4 de janeiro de 2015.

EGGEN, T.; VETHE, Ø. Stability indices for different composts. **Compost Science & Utilization**, v. 9, n. 1, p. 19-26, 2001.

EL-KADY, A. F. Y.; SULOMA, A. Towards Wastewater-Aquaculture-Agriculture Integration in Arid and Semi-Arid Regions: Utilization of Aquaculture Effluents in the Irrigation of Khaya and Mahogany Seedlings. **Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants** 5 (3): 227-237, 2013.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 291-308, 1999.

FANNING, K. J., et al. Astaxanthin profiles and corresponding colour properties in Australian farmed black tiger prawn (*Penaeus monodon*) during frozen storage. **Aquaculture Research**, 2014.

GODFRAY, H. C. J., et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

GRANT, Krystan R. Fish Hematology and Associated Disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 83-103, 2015.

GU, Z., et al. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1082-1088, 2008.

GUDMUNDSDÓTTIR, B. K.; BJÖRNSDÓTTIR, B. Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. **Vaccine**, 25(30), 5512-5523, 2007.

GÜROY, Betül et al. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. **Aquaculture International**, v. 20, n. 5, p. 869-878, 2012.

HARRISON, E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 1, p. 70-77, 2012.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175-194, 2002.

HO, A. L. F. C., et al. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. **Aquaculture International**, v. 21, n. 2, p. 361-374, 2013.

HU, F., et al. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 949, p. 79-86, 2014.

HU, P., et al. Draft Genome Sequence of *Rubrivivax gelatinosus* CBS. *Journal of bacteriology*, 194(12), 3262-3262, 2012.

JAYATHILAKAN, K., et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of food science and technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JØRGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Carotenoid scavenging of radicals. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 196, n. 5, p. 423-429, 1993.

KALINOWSKI, C. T., et al. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, lipid composition and post-mortem skin colouration of red porgy *Pagrus pagrus*. **Aquaculture international**, v. 19, n. 5, p. 811-823, 2011.

KIM, S., et al. Effects of Dietary Astaxanthin on Innate Immunity and Disease Resistance against *Edwardsiella tarda* in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. **Israel Journal Aquacult-Bamid** 64: 1-6, 2011.

- KOUZUMA, Atsushi; WATANABE, Kazuya. Microbial Ecology Pushes Frontiers in Biotechnology. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 1, p. 1-3, 2014.
- LABH, S. N.; SHAKYA, S. R. Application of immunostimulants as an alternative to vaccines for health management in aquaculture. **International Journal Fish Aquatic Studies** 2(1): 153-156, 2013.
- LADEMANN, J., et al. Interaction Between Free Radicals and Antioxidants in Human Skin. **Non Invasive Diagnostic Techniques in Clinical Dermatology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 203-215, 2014.
- LI, R. Y.; FANG, H. H. P. Hydrogen production characteristics of photoheterotrophic *Rubrivivax gelatinosus* L31. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 3, p. 974-980, 2008.
- LIMA, L. K. F., et al. Recuperação De Biomassa Bacteriana Produzida No Tratamento De Efluente Industrial. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 4, 2013.
- LIU, L., et al. Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 47, n. 1, p. 17-24, 2014.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & shellfish immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MAIANI, G., et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. S2, p. S194-S218, 2009.

MANESS, P. C., et al. Characterization of the oxygen tolerance of a hydrogenase linked to a carbon monoxide oxidation pathway in *Rubrivivax gelatinosus*. **Applied and environmental microbiology**, 68(6), 2633-2636, 2002.

MARTINS, M. L. et al. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 640-646, 2004.

MCLAREN, J. S. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 339-342, 2005.

MÉRIDA, W., et al. Enhanced hydrogen production from indirectly heated, gasified biomass, and removal of carbon gas emissions using a novel biological gas reformer. **International journal of hydrogen energy**, 29(3), 283-290, 2004.

MMA. Biomassa. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/biomassa>. Acessado dia 22/02/2015. 2015.

MUISWINKEL, W. B.; NAKAO, M. A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 43, n. 2, p. 130-150, 2014.

NAGASAWA, T., et al. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

NAGASHIMA, S., et al. Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 13, p. 3541-3542, 2012.

NAKAO, M., et al. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1296-1308, 2011.

NEWAJ-FYZUL, A.; AUSTIN, B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases.

Journal of fish diseases, 2014.

NGO, D., et al. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 523-529, 2011.

NIU, J., et al. Effect of dietary astaxanthin on growth, survival, and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 6, p. 795-802, 2009.

OTTESTAD, S., et al. Effects of storage atmosphere and heme state on the color and visible reflectance spectra of salmon (*Salmo salar*) fillets. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7825-7831, 2011.

PAN, C. H.; CHIEN, Y. H.; WANG, Y. J. Antioxidant defense to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 258-266, 2011.

PATEREK, J. R. **Method and apparatus for hydrogen production from organic wastes and manure**. U.S. Patent n. 6,887,692, 3 maio 2005.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 7, n. 1-6, p. 253-258, 1989.

PONSANO, E.H.G., et al. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and technology** 45, 445–449, 2002.

- PONSANO, E. H. G.; LACAVALA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 46, n. 2, p. 143-147, 2003.
- PONSANO, E. H. G.; PAULINO, C. Z.; PINTO, M. F. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3836-3842, 2008.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. **SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES**, v. 2, n. 2007, p. 47-51, 2007.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Métodos para análise hematológica em peixes. **Maringá: EdUEM**, 2013.
- REYNDERS, M. B., et al. Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology letters**, 18(6), 649-654, 1996.
- SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, 172:63-92, 1999.
- SAMAD, A. P. A., et al. Effects of dietary katuk (*Sauropus androgynous* L. Merr.) on growth, non-specific immune and diseases resistance against *Vibrio alginolyticus* infection in grouper *Epinephelus coioides*. **Fish & shellfish immunology**, v. 36, n. 2, p. 582-589, 2014.
- SANTO, E. F. E., et al. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 1, p. 47-51, 2013.

- SASAKI, K., et al. Use of photosynthetic bacteria for the production of SCP and chemicals from organic wastes. **Bioconversion of waste materials to industrial products**, p. 247-292, 1998.
- SCHLOSS, J. M.; VITETTA, L. Antioxidants to abrogate free radicals: new insights to challenge currently held beliefs. **Australian Journal of Herbal Medicine**, v. 26, n. 1, p. 4, 2014.
- SCOLNIK, P. A., et al. Biosynthesis of carotenoids derived from neurosporene in *Rhodopseudomonas capsulata*. **The Journal of biological chemistry**, 255 (6): 2427–32, 1980.
- SEBASTIÃO, F. A. Avaliação da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em peixes. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2015.
- SECOMBES, C. J.; FLETCHER, T. C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 53-71, 1992.
- SELVARAJ, V., et al. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 19, n. 4, p. 293-306, 2005.
- SHEIKHZADEH, N., et al. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 6, p. 1268-1269, 2011.
- SOMMERSET, I., et al. 1st edition. **Vaccines for fish in aquaculture**. Future Drugs Ltd., 2005.

- STECK, N.; GRASSL, G. A. Free Radicals and Pathogens—Role for Reactive Intermediates in Innate Immunity. **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**, p. 393-406, 2014.
- STEIGER, S., et al. Substrate specificity of the expressed carotenoid 3, 4-desaturase from *Rubrivivax gelatinosus* reveals the detailed reaction sequence to spheroidene and spirilloxanthin. **Biochemistry Journal**, 349, 635-640, 2000.
- SUPAMATTAYA, K. et al. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 248, n. 1, p. 207-216, 2005.
- TAKENO, K., et al. Removal of phosphorus from oyster farm mud sediment using a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* IL106. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 4, p. 410-415, 1999.
- TANAKA, T., et al. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3202-3242, 2012.
- TANG K-H., et al. Carbon Metabolic Pathways in Phototrophic Bacteria and Their Broader Evolutionary Implications. **Frontier Microbiology** 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00165, 2012.
- TAVARES-DIAS, M.; DE MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Marcos Tavares-Dias, 2004.
- TIZARD, I. 9th edition. **Veterinary Immunology**. Elsevier Inc., 2013.
- TORT, L., et al. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.
- URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 205-244, 2005.

- VASEEHARAN, B.; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, n. 3, p. 1079-1091, 2014.
- VOGEL, J. T., et al. Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 13, p. 2233-2240, 2010.
- WADE, N. M., et al. Evolution of a novel carotenoid-binding protein responsible for crustacean shell color. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 8, p. 1851-1864, 2009.
- WAWROUSEK, K., et al. Genome Annotation Provides Insight into Carbon Monoxide and Hydrogen Metabolism in *Rubrivivax gelatinosus*. **PloS one**, 9(12), e114551, 2014.
- WILLEMS, A., et al. Transfer of *Rhodocyclus gelatinosus* to *Rubrivivax gelatinosus* gen. nov., comb. nov., and phylogenetic relationships with *Leptothrix*, *Sphaerotilus natans*, *Pseudomonas saccharophila*, and *Alcaligenes latus*. **International journal of systematic bacteriology**, 41(1), 65-73, 1991.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, 51 (2): 221–71, 1987.
- YAHYAEE, R., et al. Waste fish oil biodiesel as a source of renewable fuel in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 17, p. 312-319, 2013.
- YANG, P., et al. Origin of the phagocytic respiratory burst and its role in gut epithelial phagocytosis in a basal chordate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 70, p. 54-67, 2014.
- YANO, T. 3 The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. **Fish Physiology**, v. 15, p. 105-157, 1997.

YAVUZCAN-YILDIZ, H.; KIRKAVGAÇ-UZBILEK, M. The evaluation of secondary stress response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Val. 1844) after exposing to the saline water. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 287-290, 2001.

ŽILIĆ, S., et al. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1224-1231, 2012.

ZILLES, J. L., et al. Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2763-2769, 2002.

CAPÍTULO 2

Rubrivivax gelatinosus bacterial biomass produced from
wastewater improves fish health

(Artigo nas normas da revista PlosOne)

***Rubrivivax gelatinosus* bacterial biomass produced from wastewater improves fish health**

Sílvia Umeda Gallani¹, Gustavo Moraes Ramos Valladão¹, Elisa Helena Giglio Ponsano² and Fabiana Pilarski^{1*}

¹ Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA), Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

² Laboratório de Alimentos, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author at:

E-mail: fabianap@caunesp.unesp.br

Abstract

1
2 In the future the demand for food will raise and high production of waste in the food
3 industry will be a huge problem. The development of techniques that employ the use of
4 microorganisms to obtain useful products is a recent issue with expectation to greater
5 use only in future. Bacteria *Rubrivivax gelatinosus* used for effluent treatment was
6 studied to assess biotechnological usage of its biomass as a feed additive for fish at 0.5
7 and 1.5 mg/kg in commercial diet during 2 months to young pacu (*Piaractus*
8 *mesopotamicus*). Hematological, biochemical and immunological parameters were
9 assessed at days 0, 30 and 60. Besides the *R. gelatinosus* use as a effluent cleaner, it was
10 discovered that the use of its biomass in feed improves fish health by improvement of
11 phagocyte cells, reduction on the time to activation of the complement system and by
12 improvement of energy status of fish.

13 **Keywords:** antioxidant; aquaculture; biotechnology; carotenoid; effluent treatment;
14 immunity.

Introduction

In 2012, world production of fish exceeded the production of beef [1], but the demand for food will continue to grow over the coming years with the increasing of world population, as well as the residues generated from food industry. Thus there is a growing demand for development of alternative sources to recover all the waste generated in this activity. Biotechnology based on achieving sustainable energy sources, through mechanisms that nature already uses, can be a solution to the problem of these finite resources. The combination of the use of biomass with new approaches to bioprocessing would be the best opportunity to create a sustainable platform applicable in future [2]. Owning biotechnological alternative sources for obtaining biomass can make this theory much more effective. In aquaculture, solid waste from fish industry has some options for using such as fish meal [3], fish oil [4], silage [5] and composting [6], whereas fish slaughterhouse effluent (liquid waste) is generated in aquaculture on a large scale and has few use for industries being the main use for agricultural irrigation [7].

Rubrivivax gelatinosus is a photoheterotrophic facultative bacterium present in ponds, sewage, sludge, and food industries waste [8] which plays a role in depollution, being able to treat industrial poultry [9] and fisheries wastewater, reducing significantly in 43% the amount of organic material capable of being oxidized in only 72 hours of cultivation [10]. In this process, *R. gelatinosus* metabolizes effluent saturated in organic matter producing a biomass which is rich in proteins, vitamins and carotenoids [11],[12] identified as lycopene and neurosporene [13]. This biomass shows a great potential for use as a feed additive.

Carotenoids are contemplated by several functions with at least six of those mentioned in the literature: natural coloring of many foods [14], the most potent

precursor of vitamin A [14] as well as precursor of volatile compounds responsible for flavor in food [16]; antioxidant [17], protective against lipid peroxidation [18] and inhibitor of certain types of cancer [19]. Traditionally used as a pigment, carotenoids are also known to perform essential functions in biological systems [20]. There has been demonstrated that carotenoids has the ability to improve the symptoms of chronic and degenerative diseases in humans [21] and are reported to improve the immunity of farm animals, such as birds [22] and swine [23] but none use of wastewater to improve the immune system of fish was ever reported. Also it is important to notice that this biomass may have other immunostimulatory sources not mentioned yet, besides the carotenoids and minerals.

In aquaculture, additives containing carotenoids showed positive effects on fish [24],[25],[26] and shrimp production [27],[28], and also on immunological parameters of fish[29]. In addition, carotenoids in the food increased resistance of aquatic organisms submitted to stress [25], [27], [30]. Thus, products containing carotenoids cannot be considered only as a group of pigments, but also as substances with very promising properties to fish health.

Nutritional factors considered immunostimulants are an alternative to prevent and control fish pathogens being able to replace the use of chemicals and antibiotics in fish farming which occasionally can be potentially toxic to animal and harmful to environment, enabling the development of resistance in the pathogens and thereby putting in risk human health [31]. Within these aspects, *R. gelatinosus* biomass should be evaluated for use in aquaculture overdue it promotes the treatment of industrial effluent and produces a by-product with nutritional potential. Therefore, in this study we evaluated the effect of their inclusion on performance, hematological, biochemical and immunological response in fish.

Material and Methods

Production of *Rubrivivax gelatinosus* biomass

Rubrivivax gelatinosus has being maintained in Pfennig semi-solid agar and was reactivated for inoculum preparation, according to Ponsano *et al.* [32], a few days before wastewater collect. Wastewater containing high concentrations of organic matter (derived of skinning, evisceration, filleting and freezing from Nile Tilapia processing industry) from a fish slaughterhouse was used as raw material for the biomass obtainment. This material was first filtered (50 μm mesh fast filter, Gardena 1731; 3,000 L h⁻¹) and the resulting water was pasteurized (65°C/ 30 minutes) to remove any bacteria capable of inhibiting or reducing the growth of *R. gelatinosus*. After cooling at room temperature, wastewater was transferred to glass reactors (4 tanks with capacity of 50 L) and mixed with pre-prepared inoculum of *R. gelatinosus*. The tanks were filled and illuminated with 60 W lamps to promote favorable conditions for the bacterial growth (anaerobiosis and lighting).

One week after the inoculation, the product was filtered at 0.2 μm , 1.5 m³/ h and 4.5 bar (Frings), resulting in wet samples (containing the cell mass) which were concentrated by centrifugation (3.400 g/ 30 min/5°C). For powdered biomass the samples were freeze-dried (Liobrás L101) in the conditions of -40° C, flow rate 10.2 m³/h and vacuum 3.7 μHg . The biomass was vacuum-packed and wrapped in a dark bag to prevent oxidative degradation and stored in refrigerator, according to a study which favors the oxidative stability of the product for 1.5 years [33].

Total carotenoid content in biomass was analyzed in duplicate following method adapted by Liaaen-Jensen & Jensen [34] and showed 3.72 mg carotenoids to 1 g of biomass. The amount of lipids (soxhlet method), ash (heating in muffle at 500°C), moisture (oven drying method - 105°C) and protein (kjeldahl method) in the sample of

biomass were determined in duplicate following the methods recommended by the AOAC [35], resulting in 19 % of fat, 52 % of protein, 3 % of moisture and 5 % of ash.

Experiment design and diet production

Three hundred pacu *Piaractus mesopotamicus* (116.4 g ± 20.5) were obtained from commercial fish farm. Fish were divided into 24 tanks of 300 L with aeration and continuous flow of water and kept with commercial feeding (2 % body weight) during 30 days for acclimation.

To the experiment, fish were randomly distributed in three treatments (with 8 replicates): in control, fish were fed with basal diet (commercial feed), whereas fish from other 2 treatments were fed with 0.5 g/kg and 1.5 g/kg of *R. gelatinosus* biomass, respectively. To diet production, commercial feed was automatic crushed, homogenized with distilled water (50 % of the feed weight), and the mass was passed through electric meat grinder. For the production of the treatment diets, the biomass was weighed on a precision scale and mixed to commercial feed mass. The pellets were dried in an air flow oven for 20 hours at 55 °C. After, it was properly stored in dark bags and then frozen until use, to not affect the concentration of carotenoids and its viability through oxidative process. New diet production was performed every 20 days of experiment.

Fish were fed 3 times (total of 2 % of body weight) daily during 60 days. At day 0, 30 and 60 of experiment, 16 fish per treatment were sampled. For the collection of physiological samples, fish were anesthetized in an aqueous solution of eugenol (50 mg/L) and blood was collected from caudal vessel for hematological, biochemical and immunological analyses. Subsequent, anesthetized fish were euthanized by vertebral disruption to collect the liver for enzymes analyses. The study was approved by Ethics and Animal Welfare Committee of the School of Agricultural Sciences and Veterinary

Medicine of São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil under protocol number 027370/13.

Water parameters were kept constant during the experimental period. Measurements were performed weekly and temperature was 28.87 ± 0.39 (°C); dissolved oxygen was 5.15 ± 0.41 mg/L and the pH was 7.54 ± 0.13 (mean \pm standard deviation).

Hematological Analysis

Hemogram (hematocrit, hemoglobin and erythrocytes, thrombocytes and leucocytes cells counting) was performed using total blood diluted in 10 μ l of heparin 5000 IU. For erythrocyte count (RBC) it was diluted 1: 200 blood in formalin-citrate solution was used with a Neubauer counting chamber according to Hesser [36]. Values were measured in 10^6 cells/ m^3 . Dosage of hematocrit (%) was established by the technique of microhematocrit [37] and hemoglobin dosage (g/dL) with Labtest[®] kit reference 43. From data obtained, erythrocyte indices of mean corpuscular volume (MCV was calculated by hematocrit/ RBC*10 and measured in fl), mean cell hemoglobin (MCH was calculated by hemoglobin/ RBC *10 and measured in pg) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC was calculated by hemoglobin/ hematocrit and measured in %) were calculated. Blood extensions were stained with May Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW), and used for blood cells counting [38]. The complete blood count provided white blood cells (WBC) and thrombocytes data with counting of 2000 erythrocytes. Reading was performed on entire length of the smear. For differential blood cell counting, 200 white blood cells counting were performed (lymphocyte, monocyte, neutrophil, eosinophil and LG-PAS special granulocytic cell).

Biochemical Analysis

Total protein and albumin were performed with serum analysis in spectrophotometer with Labtest® Kit reference 19-1/ 250. From data obtained globulin was calculated subtracting the value of serum albumin from protein [39]. Values were obtained in g/dL.

To determine levels of physiological stress, cortisol and glucose were evaluated and after associated with leukogram. Glucose were measured with total blood, using the equipment AccuChek Performa® in mg/dL and cortisol levels measured ($\mu\text{g/dL}$) in spectrophotometer with kit Biomedix® enzyme immunoassay using serum.

For analyses of antioxidant enzymes, 100 mg of hepatic tissue was homogenized with 1 ml of buffer and then centrifuged at 1000 G for 10 minutes at 4°C, following Gallagher *et al.* protocol [40]. Supernatant was used for Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidation (LPO) and protein analyses.

Analyses of SOD were performed using method purposed by McCord *et al.* [41]. In this methodology SOD inhibits reduction of cytochrome C. For LPO analyses it was applied the technic with butyl hidroxytoluen which measures oxidation of lipid layer of membrane. Analyses were performed following Jiang *et al.* methodology [42]. Analyses of CAT were evaluated according to Beutler [43]. In this method, H_2O_2 is consumed by the enzyme catalase. As this enzymes have a fast action and low affinity, it is used a high quantity of hydrogen peroxide (10mM). The activity was measured in intervals during a minute of reaction at 240 nm. Proteins were measured using the method of Bradford [44] to measure the activity of each enzyme.

Immunological Analysis

Burst respiratory activity (in optical density) was performed to evaluate tendency of oxidative stress along with biochemical analysis of SOD, CAT and LPO. Respiratory activity of leukocytes assay was carried according to Biller-Takahashi *et al.* [45].

Lysozyme and complement activity acquainted analyzes for assessment of fishes immune system. Lysozyme levels were measured in U/ml according to Ellis [46] using duplicate serum samples. Complement system activities were estimate by protocol of Zanuzzo *et al.* [47].

Energy Status Analysis

Fish were weighted and length was measured. Liver were weighted and with these data it was possible to calculate the hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K). Hepatosomatic index (HSI in %) was calculated by the formula (Weight of liver/Weight of fish) *100 and Condition Factor (K) by the formula $100 * (\text{Weight of fish} / (\text{Total length (TL)}^3))$. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) analysis were performed using Labtest® kit (ref. 108 and 109, respectively) using serum and values are shown in UI/L.

Statistical analysis

In order to compare the treatments, the mixed-model procedure of the Statistical Analysis System (SAS) [48] was used, in which probabilities less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

Results

Hematological Analysis

RBC, Ht, Hg, thrombocytes and leukocytes (lymphocytes, monocytes and neutrophils) parameters significantly changed ($p<0.05$) according to the period of supplementation.

The level of biomass in feed influenced significantly to thrombocytes and neutrophils enhancing and lymphocytes decreasing ($p<0.05$) (Figure 1; Table S_1). Eosinophils were not found in leukocyte count.

Values of MCV, MCH, MCHC and CGE were kept constant during the two months of feeding and they were not influenced by period and diet (Table_S1).

Biochemical Analysis

Glucose levels were higher according to increasing amounts of biomass in feed ($p<0.05$) (Figure 2). Cortisol increases ($p<0.05$) at the higher level of biomass included in feed (Figure 2). Protein, albumin and globulin did not differ between treatments. Antioxidant enzymes SOD, CAT and also analyses of LPO did not differ between treatments (Table_S2).

Immunological Analysis

Complement system significantly differed among treatments. The period for activate the system reduced according to biomass levels in diet increased ($p<0.05$) (Figure 3). The activity of respiratory oxidative burst was lower ($p<0.05$) according to biomass inclusion in diet (Figure 3). Lysozyme did not differ between treatments ($p>0.05$) (Table_S3).

Energy Status Analysis

Weight and Hepatosomatic index (HSI) significantly differed among treatments, increasing according to addition of biomass levels in diet ($p < 0.05$) (Figure 4). Condition factor did not differ between treatments. ALT and AST did not differ between fish fed with supplemented and control diet (Table_S4).

Discussion

There are no studies using *R. gelatinosus* metabolite as a potential immunostimulant for fish feed additive. In fish health, the improvement of innate immune system comprising by leukocytes synthesis and complement system activation are especially important and the administration of dietary antioxidants (e.g. carotenoids) to help the fight against oxidative stress is convenient. Diets with antioxidant properties can become a limiting factor of immunopathology [49]. In fish, innate immunity is considered the main mechanism of defense against pathogens, and this system potentiates the ability of phagocytic cells and antibodies, which can result in efficient elimination of foreign pathogens and induction of the acquired immune response. Due to the improvement of some stages of the innate immune system, the whole complex chain of this system is benefited by diet.

To make possible the use of an immunostimulatory dietary additive is essential that its use not cause hematological abnormalities. Biomass supplementation three times a day ensures healthy fish, without any deleterious hematological signs. Still, in total blood cells counting, the increasing number of leukocytes and thrombocytes in factor of biomass supplementation indicates immunostimulant character of biomass dose-dependent. Administration of a dietary additive with a consequent increasing of

thrombocytes can be linked to the immunostimulatory characteristic of the diet since thrombocytes have phagocytic activity against antigens [50]. Moreover, in addition to the immunostimulatory character of the diet containing biomass, in differential WBC counting the group supplemented with the highest concentration of biomass presents lower percentage of lymphocytes in consequence of increasing of granulocyte cells. Neutrophils and monocytes (circulating blood cells, precursor of macrophages) enhanced in consequence of biomass administration and these cells are considered the most important phagocytic cells [51]. These phagocytic cells combat antigens through the release of ROS and NO (Nitric Oxide), and this process is not considered just a stage of innate immune system activity, but a step for the response of the acquired immune system, as in immunology there is a large chain of cooperation between the innate immune system (phagocytic cells) and acquired immune system (immunoglobulins) [52]. Even with leukocytes improved by this type of cells, oxidative burst was lower in fish supplemented with biomass due to the capacity of the carotenoid antioxidant to neutralizes the free radicals that are the responsible to reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) into formazan granules [45] and also LPO was not different from control group, proving great antioxidant efficacy of the biomass. This differential WBC leukogram is similarly found on stress leukogram that in fish it is manifested as a lymphopenia and a relative granulocytosis [53] and it is important to note that an immunostimulant is also classified as stressor agent, a chemical or drug that enhances the innate (non-specific) immune system activating them by directly interaction [54]. Besides biomass, several others microorganisms components (β-glucans, lipopolysaccharide and *Vibrio anguillarum* cells) are successfully used as immunostimulants [55], mainly for acting as a stressor agent, confirming the reason of the increase in cortisol in animals treated with the supplemented diet.

The administration of biomass significantly active complement system that is considered one of the main immune defenses in fish and its use discloses a rapid activation of proteins cascade as the dose of supplement increases in feed. The complement system has already been well quoted in several studies in aquaculture, and speculate which pathway of this system is more active in fish is tempting [52]. Complement system alerts the host of the presence of pathogens and their clearing and also it is fundamental on development of an acquired immune response. There are three existing pathways (classical, alternative or lectin) composing this system and they are responsible to promote phagocytosis, respiratory burst, antigen-uptake process formation of the membrane attack complex (MAC) which cause antigen cells lysis and also inflammation, leukocyte chemotaxis, Reactive Oxygen Species (ROS or free radicals) production and TNF IL-1, IL-6 and IL-8 production [56]. This system was already suggest a potent defense of innate immune system, moreover even been proposed that some pathways in fish are more developed than in mammals [57] and it is well known that animals who are depleted of complement have a strongly reduced ability to mount an optimal immune response [58]. As other physiological mechanisms in fish, it also can be affected by extrinsic factors such as environmental conditions as well as intrinsic factors such as age or condition of the body [52] being the dietary factor of extreme relevance.

Among functions of liver, the proteins synthesis like albumin and the production of coagulation factors and erythrocytes are highlighted because these biochemical parameters can be affected by diet [59], [60]. Liver is also responsible to storage glycogen as energy source and diet with high doses of lipids can cause steatosis. So, both ALT and AST were evaluated to ensure the health status of the liver whereas high values of these enzymes can indicate liver damage or disease. Sheikhzadeh *et al.* [60] found that high doses of another natural source of carotenoids *Haematococcus pluvialis*

supplementation (10 g/kg) increases AST rates, but the values of both enzymes after biomass supplementation ensure no toxic activity or overload of liver in both concentrations of biomass in feed (0.5 and 1.5 mg/Kg). With the weight of the body and/or weight of the liver it is possible to calculate the hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K) that are indirect indices indicatives of health status and measures of energy status [61]. Fish supplemented with enhance quantities of biomass proves a higher amount of glucose circulating in blood and also higher energy reserve and even diet with addition upper quantities of biomass (1.5 g/Kg) provides an animal with highest growth rate and better health with more energy reserves.

As another beneficial factor, this by-product derivate from effluent can be a growing promotor. According to Ma *et al.* [62] both intrinsically (genetic) and extrinsically (environment conditions such as dietary supplementation and also physiological regulation of stress) characters influences on growth performance. However, in this study, besides the improvement of fish healthy the biomass content may have influenced significantly to improve zootechnical parameters.

R. gelatinosus biomass enhances fish health by increased phagocytic blood cells, rapid activation of the complement system and improves the energy status, which provides exploitation for a current environmental issue of wastewater recovery.

References

1. Earth Policy Institute (2013) Farmed Fish Production Overtakes Beef. Available: http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114. Accessed 4 January 2015.
2. McLaren JS (2005) Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. Trends Biotechnol 23(7): 339-342.

3. Jayathilakan K, Sultana K, Radhakrishna K, Bawa AS (2012) Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol* 49(3): 278-293.
4. Yahyaee R, Ghobadian B, Najafi G (2013) Waste fish oil biodiesel as a source of renewable fuel in Iran. *Renew Sust Energ Rev* 17: 312-319.
5. Al-Abri AS, Mahgoub O, Kadim IT, Al-Marzooqi W, Goddard SJ, Al-Farsi M (2014) Processing and evaluation of nutritive value of fish silage for feeding Omani sheep. *J Appl Anim Res* 42(4): 406-413.
6. Eggen T, Vethe Ø (2001) Stability indices for different composts. *Compost Sci Util* 9(1): 19-26.
7. El-Kady AF, Suloma A (2013) Towards Wastewater-Aquaculture-Agriculture Integration in Arid and Semi-Arid Regions: Utilization of Aquaculture Effluents in the Irrigation of Khaya and Mahogany Seedlings. *J Horticult Sci Ornamental Plants* 5(3): 227-237.
8. Nagashima S, Kamimura A, Shimizu T, Nakamura-Isaki S, Aono E, *et al.* (2012) Complete Genome Sequence of Phototrophic Betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. *J Bacteriol* 194(13): 3541–3542.
9. Ponsano EHG, Paulino CZ, Pinto MF (2008) Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. *Bioresour Technol* 99: 3836-3842.
10. Lima LKF, Ponsano EHG, Pinto MF (2011) Cultivation of *Rubrivivax gelatinosus* in fish industry effluent for depollution and biomass production. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 2553-2558.
11. Ponsano EHG, Lacava PM, Pinto MF (2003) Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. *Braz Arch Biol Technol* 46(2): 143–147.

12. Ponsano EHG, Pinto MF, Garcia-Neto M, Lacava PM (2004) Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. *Braz J Poult Sci* 6(4): 237–242.
13. Harada J, Nagashima KV, Takaichi S, Misawa N, Matsuura K, et al. (2001) Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene. *Plant Cell Physiol* 42(10): 1112-1118.
14. Žilić S, Serpen A, Akıllıoğlu G, Gökmen V, Vančetović J (2012) Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Agric Food Chem* 60(5): 1224-1231.
15. Harrison EH (2012) Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1821(1): 70-77.
16. Vogel JT, Tieman DM, Sims CA, Odabasi AZ, Clark DG, Klee HJ (2010) Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Agric Food Chem* 90(13): 2233-2240.
17. Ngo DH, Wijesekara I, Vo TS, Van Ta Q, Kim SK (2011) Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview. *Food Res Int* 44(2): 523-529.
18. Alshatwi AA (2012) Beneficiary Antilipoperoxidative Effect Of Lycopene On H₂O₂-Supplemented Oxidative Stressed Rats—A Dose-Dependent Study. *J Food Biochem* 36(2): 149-158.
19. Tanaka T, Shnimizu M, Moriwaki H (2012) Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules* 17(3): 3202-3242.
20. Amar EC, Kiron V, Akutsu T, Satoh S, Watanabe T (2012) Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)

experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids. *Aquaculture* 330: 148-155.

21. Maiani G, Caston MJP, Catasta G, Toti E, Cambrodon IG, et al. (2009) Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability, bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 53(2): 194-298.

22. Fard SH, Toghiani M, Tabeidian SA (2014) Effect of oyster mushroom wastes on performance, immune responses and intestinal morphology of broiler chickens. *Int J Recycling Org Waste Agric* 3(4): 141-146.

23. Lei Y, Kim IH (2014) Effect of *Phaffia rhodozyma* on performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and meat quality in finishing pigs. *J Anim Sci* 92(1): 171-176.

24. Kalinowski CT, Robaina LE, Izquierdo MS (2011) Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, lipid composition and post-mortem skin colouration of red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquac Nutr* 19: 811–823.

25. Pan CH, Chien YH, Wang YJ (2011) Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquac Nutr* 17: 258-266.

26. Güroy B, Şahin İ, Mantoğlu S, Kayalı S (2012) Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquac Int* 20(5): 869-878.

27. Supamattaya K, Kiriratniko S, Boonyaratpalin M, Borowitzka L (2005) Effect of *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248: 207-216.

28. Niu J, Tian LX, Liu YJ, Yang HJ, Ye CX, et al. (2009) Effect of dietary astaxanthin on growth, survival, and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquac Soc* 40(6): 795-802.

29. Kim S, Song J, Kim K, Lee K (2011) Effects of Dietary Astaxanthin on Innate Immunity and Disease Resistance against *Edwardsiella tarda* in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Isr J Aquacult-Bamid* 64: 1-6.
30. Angeles Jr IP, Chien Y, Yambot AV (2009) Effect of Injected Astaxanthin on Survival, Antioxidant Capacity, and Immune Response of the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) Challenged with *Lactococcus garvieae*. *J Shellfish Res* 28(4): 931-937.
31. Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2015) Phytotherapy as an alternative for treatment of fish disease. *J Vet Pharmacol Ther.* In press.
32. Ponsano EHG, Lacava PM, Pinto MF (2002) Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. *Braz Arch Biol Technol* 45(4): 445-449.
33. Gouveia L, Empis J (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innov Food Sci Emerg Technol* 4(2): 227-233.
34. Liaaen-Jensen S, Jensen A (1971) Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues: total carotenoid content. In: Pieter AS, editor. *Methods in enzymology: photosynthesis and nitrogen part A*. New York: Elsevier. pp. 586-602.
35. AOAC (1990) *Official Method of Analysis*. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
36. Hesser EF (1960) Methods for routine fish hematology. *Prog Fish Cult* 22(4): 164-171.
37. Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosius E (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am J Clin Pathol* 56: 35-39.
38. Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI (2013) *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: EdUEM. 140 p.

39. Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir-Naghadeh B, Pourseyed SH (2014) Evaluation of serum total protein concentration and protein fractions in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. *Comp Clin Pathol* 23(1): 151-155.
40. Gallagher EP, Canada AT, Di Giulio RT (1992) The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquat Toxicol* 23(3): 155-168.
41. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
42. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26(10): 853-856.
43. Beutler E (1975) Red cell metabolism: manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton. 160 p.
44. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1): 248-254.
45. Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC (2013) Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz J Biol* 73(2): 425-429.
46. Ellis AE (1990) Lysozyme Assays. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Muiswinkel WB, editors. *Techniques In Fish Immunology*. California: Sos Publications. 220 p.
47. Zanuzzo FS, Urbinati EC, Rise ML, Hall JR, Nash GW, *et al.* (2015) *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 435: 1-9.
48. SAS Institute (2008) SAS/STAT 9.2 User's guide. SAS Institute Inc, Cary, NC.

49. Babin A, Siciat C, Gaillard M, Troussard JP, Motreuil S, *et al.* (2014) Limiting immunopathology: interaction between carotenoids and enzymatic antioxidant defences. *Dev Comp Immunol* 49(2): 278-281.
50. Nagasawa T, Nakayasu C, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T, *et al.* (2014). Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Front Immunol* 5: 445.
51. Secombes CJ, Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis* 2: 53-71.
52. Van Muiswinkel WB, Nakao M (2014) A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. *Dev Comp Immunol* 43(2): 130-150.
53. Clauss TM, Dove AD, Arnold JE (2008) Hematologic disorders of fish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 11(3): 445-462.
54. Labh SN, Shakya SR (2013) Application of immunostimulants as an alternative to vaccines for health management in aquaculture. *Int J Fish Aquat Stud* 2(1): 153-156.
55. Sakai M (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172(1): 63-92.
56. Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 20(2): 239-262.
57. Yano T (1997) The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press. pp 105-157.
58. Daha MR (2011) Grand Challenges in Molecular Innate Immunity. *Front Immunol* 2: 16.
59. Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS (2010) Supplementation diet containing probiotics, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. *Fisheries Aquac J* 4: 1-11.

60. Sheikhzadeh N, Nofouzi K, Delazar A, Oushani AK (2011) Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 31(6): 1268-1269.
61. Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J Fish Biol* 47(5): 775-787.
62. Ma X, Wang F, Han H, Wang Y, Lin Y (2014) Replacement of Dietary Fish Meal with Poultry By-product Meal and Soybean Meal for Golden Pompano, *Trachinotus ovatus*, Reared in Net Pens. *J World Aquac Soc* 45(6): 662-671.

Figure Legends

Figure 1. Thrombocytes, neutrophils and lymphocytes cells count of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Thrombocytes measured in 2000 erythrocytes counting, neutrophils and lymphocytes cells measured in 200 leukocytes counting.

Figure 2. Glucose and cortisol analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Glucose was measured in mg/dL and cortisol in $\mu\text{g/dL}$.

Figure 3. Complement system and burst analyses of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Complement system activity was measured as the time (minutes) required for the initial optical density to be reduced by one-half and burst measured in optical density.

Figure 4. Energy Status of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Weight measured in grams and HIS (hepatosomatic index) in %.

Supporting Information Legends

Table_S1. Hematological and WBC differential count analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. RBC measured in 10^6 cells/ m^3 , Hematocrit in %, Hemoglobin in g/dL, MCV (mean corpuscular volume) in fl, MCH (mean cell hemoglobin) in pg, and MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) in g/dL, Thrombocytes and Leukocytes cells in 2000 erythrocytes counting and WBC differential count in 200 leukocytes counting.

Table_S2. Biochemical, Antioxidant enzyme (SOD and CAT) and cellular membrane damage (LPO) analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Glucose measured in mg/dL, Cortisol in μ g/dL, protein in g/dL, albumin in g/ dL and globulin in g/dL and antioxidant enzymes activity and LPO membrane cells damage analysis.

Table_S3. Immunological Analyses- Innate Immune System of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Measurement: Complement System Activity measured as the time (minutes) required for the initial optical density to be reduced by one-half, Burst measured in optical density and Lysozyme in U/ml.

Table_S4. Energy Status, ALT and AST analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

Weight measured in grams and K (condition factor), HIS (hepatosomatic index) in %, AST (aspartate transaminase) in UI/L and ALT (alanine transaminase) in UI/L.

Appendices

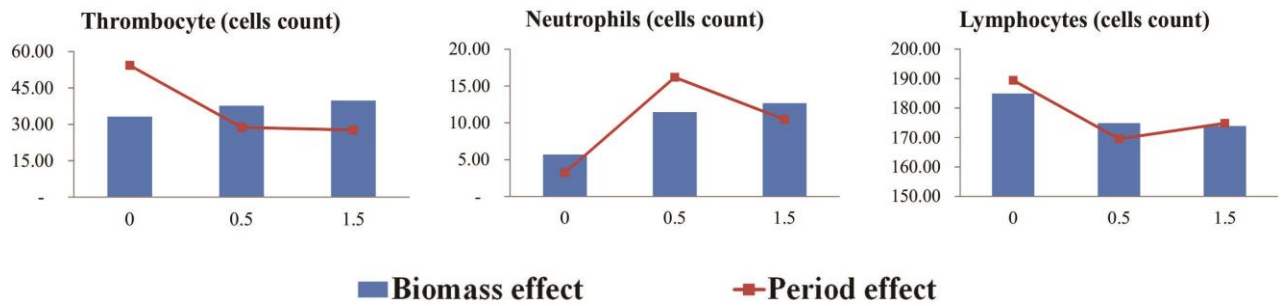


Figure 1. Thrombocytes, neutrophils and lymphocytes cells count of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

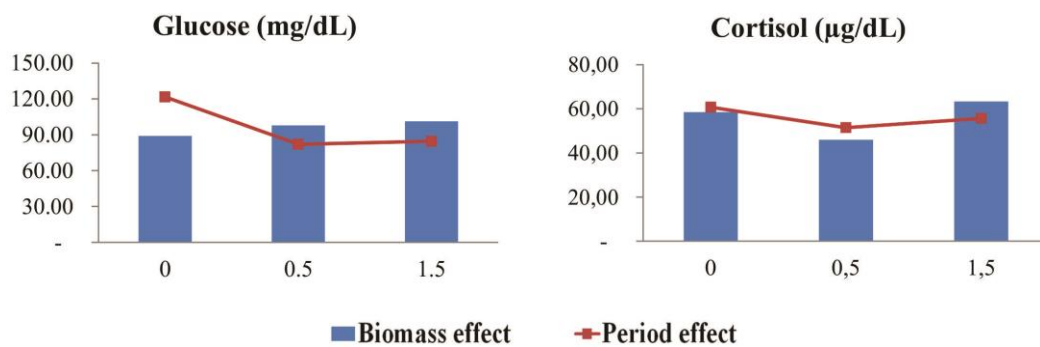


Figure 2. Glucose and cortisol analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

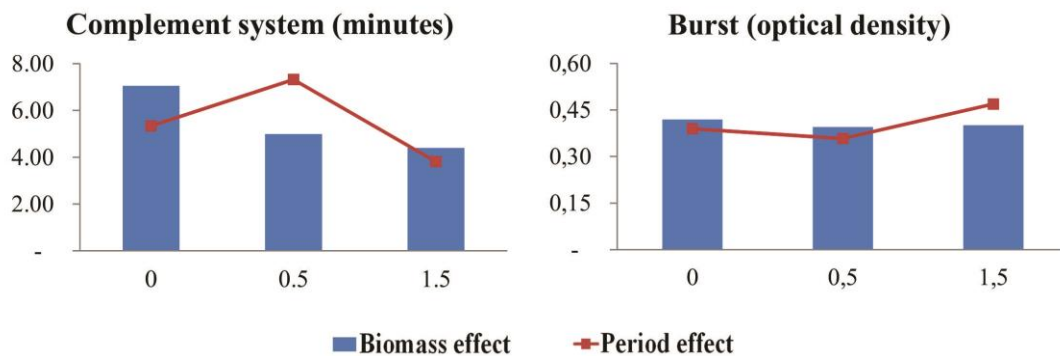


Figure 3. Complement system and burst analyses of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

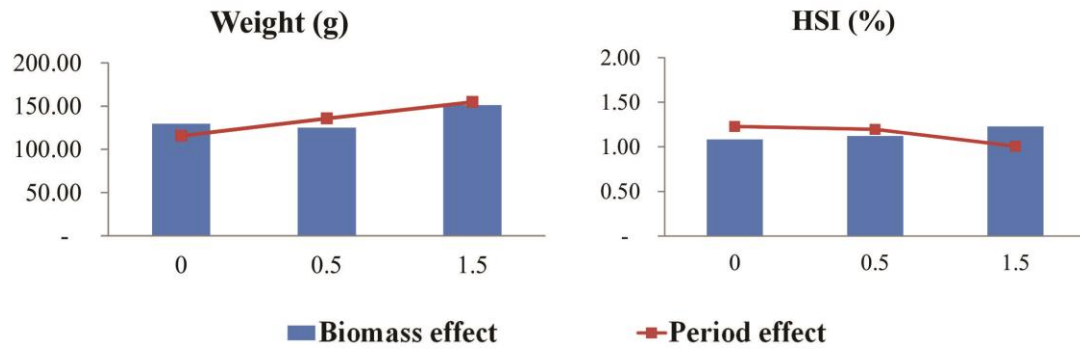


Figure 4. Energy Status of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

Table_S1. Hematological and WBC differential count analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

Hematology	Feed Group	Biomass effect		Day	Period effect	
		Mean \pm SE	p value		Mean \pm SE	p value
RBC	Control	269.70 \pm 4.65		0	265.65 \pm 5.33	
	0.5 g/kg biomass	274.54 \pm 4.65	0.168	30	256.73 \pm 3.50	0.0001
	1.5 g/kg biomass	261.89 \pm 4.71		60	283.75 \pm 4.97	
Ht	Control	39.37 \pm 0.86		0	38.40 \pm 0.86	
	0.5 g/kg biomass	40.33 \pm 0.69	0.616	30	38.60 \pm 0.77	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	40.38 \pm 0.74		60	43.08 \pm 0.66	
Hb	Control	9.57 \pm 0.18		0	9.50 \pm 0.13	
	0.5 g/kg biomass	9.90 \pm 0.16	0.057	30	9.12 \pm 0.17	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	9.40 \pm 0.13		60	10.25 \pm 0.16	
MCV	Control	1.48 \pm 0.04		0	1.48 \pm 0.05	
	0.5 g/kg biomass	1.49 \pm 0.03	0.341	30	1.51 \pm 0.04	0.566
	1.5 g/kg biomass	1.56 \pm 0.04		60	1.54 \pm 0.03	
MCH	Control	0.36 \pm 0.007		0	0.36 \pm 0.008	
	0.5 g/kg biomass	0.37 \pm 0.008	0.772	30	0.36 \pm 0.006	0.583
	1.5 g/kg biomass	0.36 \pm 0.005		60	0.36 \pm 0.005	
MCHC	Control	24.77 \pm 0.57		0	25.23 \pm 0.71	
	0.5 g/kg biomass	24.63 \pm 0.53	0.266	30	23.88 \pm 0.55	0.223
	1.5 g/kg biomass	23.59 \pm 0.55		60	23.90 \pm 0.33	
Thromb	Control	33.21 \pm 1.42		0	54.30 \pm 2.26	
	0.5 g/kg biomass	37.72 \pm 1.55	0.019	30	28.77 \pm 1.31	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	39.83 \pm 1.99		60	27.69 \pm 1.25	
Leuk	Control	10.63 \pm 0.82		0	6.78 \pm 0.43	
	0.5 g/kg biomass	11.03 \pm 0.77	0.062	30	20.15 \pm 1.13	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	13.71 \pm 1.05		60	8.44 \pm 0.65	
Lymph	Control	184.96 \pm 2.60		0	189.42 \pm 2.07	
	0.5 g/kg biomass	174.88 \pm 3.23	0.035	30	169.50 \pm 3.86	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	173.92 \pm 4.61		60	174.83 \pm 3.43	
Mono	Control	7.83 \pm 1.70		0	6.88 \pm 1.54	
	0.5 g/kg biomass	12.88 \pm 2.21	0.133	30	12.58 \pm 1.56	0.001
	1.5 g/kg biomass	12.58 \pm 2.30		60	13.83 \pm 1.83	
Neutr	Control	5.71 \pm 1.30		0	3.21 \pm 2.24	
	0.5 g/kg biomass	11.46 \pm 1.71	0.021	30	16.17 \pm 2.24	0.001
	1.5 g/kg biomass	12.67 \pm 3.07		60	10.46 \pm 2.24	
GEC	Control	0.79 \pm 0.19		0	0.50 \pm 0.17	
	0.5 g/kg biomass	0.79 \pm 0.22	0.91	30	1.13 \pm 0.29	0.12
	1.5 g/kg biomass	0.92 \pm 0.24		60	0.88 \pm 0.18	

RBC: red blood cells; Ht: hematocrit; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; Thromb: thrombocytes; Leuk: leukocytes; Lymph: lymphocytes; Mono: monocytes; Neutr: neutrophils; GEC: granulocytic special cell.

Table_S2. Biochemical, Antioxidant enzyme (SOD and CAT) and cellular membrane damage (LPO) analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/ kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

Biochemical	Feed Group	Biomass effect		Day	Period effect	
		Mean \pm SE	p value		Mean \pm SE	p value
Glucose	Control	89.13 \pm 2.12		0	121.67 \pm 2.45	
	0.5 g/kg biomass	97.90 \pm 2.12	0.0006	30	81.98 \pm 1.82	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	101.27 \pm 2.12		60	84.65 \pm 1.74	
Cortisol	Control	58.51 \pm 5.45		0	60.68 \pm 6.35	
	0.5 g/kg biomass	45.94 \pm 3.76	0.009	30	51.45 \pm 3.50	0.396
	1.5 g/kg biomass	63.34 \pm 4.06		60	55.67 \pm 2.78	
Protein	Control	4.08 \pm 0.08		0	4.86 \pm 0.10	
	0.5 g/kg biomass	4.32 \pm 0.08	0.14	30	3.79 \pm 0.07	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	4.23 \pm 0.09		60	3.98 \pm 0.08	
Albumin	Control	0.97 \pm 0.03		0	0.99 \pm 0.05	
	0.5 g/kg biomass	0.95 \pm 0.03	0.694	30	0.89 \pm 0.02	0.0055
	1.5 g/kg biomass	0.93 \pm 0.03		60	0.97 \pm 0.02	
Globulin	Control	3.09 \pm 0.07		0	3.70 \pm 0.08	
	0.5 g/kg biomass	3.25 \pm 0.07	0.182	30	2.91 \pm 0.05	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	3.26 \pm 0.07		60	2.99 \pm 0.08	
SOD	Control	0.77 \pm 0.13		0	0.80 \pm 0.09	
	0.5 g/kg biomass	0.69 \pm 0.07	0.722	30	0.60 \pm 0.13	0.19
	1.5 g/kg biomass	0.77 \pm 0.08		60	0.84 \pm 0.03	
CAT	Control	61.32 \pm 2.33		0	61.32 \pm 1.88	
	0.5 g/kg biomass	57.85 \pm 2.33	0.162	30	59.98 \pm 2.46	0.0002
	1.5 g/kg biomass	54.81 \pm 2.33		60	52.69 \pm 1.52	
LPO	Control	42.81 \pm 3.77		0	53.24 \pm 4.40	
	0.5 g/kg biomass	35.18 \pm 2.13	0.229	30	39.47 \pm 3.91	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	36.97 \pm 4.05		60	22.26 \pm 0.69	

SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; lipoperoxidation.

Table_S3. Immunological Analyses- Innate Immune System of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/ kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

Immunological	Feed Group	Biomass effect		Day	Period effect	
		Mean \pm SE	p value		Mean \pm SE	p value
Complement	Control	7.06 \pm 0.67		0	5.33 \pm 0.50	
	0.5 g/kg biomass	4.99 \pm 0.47	0.008	30	7.31 \pm 0.71	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	4.40 \pm 0.46		60	3.81 \pm 0.36	
Burst	Control	0.42 \pm 0.007		0	0.39 \pm 0.008	
	0.5 g/kg biomass	0.40 \pm 0.007	0.046	30	0.36 \pm 0.007	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	0.40 \pm 0.007		60	0.47 \pm 0.006	
Lyzosyme	Control	18.3 \pm 0.86		0	19.70 \pm 0.58	
	0.5 g/kg biomass	18.86 \pm 0.99	0.73	30	18.78 \pm 0.77	0.044
	1.5 g/kg biomass	17.97 \pm 0.56		60	16.66 \pm 1.05	

Table_S4. Energy Status, ALT and AST analysis of fish from control group and groups fed with 0.5 and 1.5 g/kg of *Rubrivivax gelatinosus* biomass.

Energy status	Feed Group	Biomass effect		Day	Period effect	
		Mean \pm SE	p value		Mean \pm SE	p value
Weigth	Control	129.62 \pm 3.72		0	115.65 \pm 2.96	
	0.5 g/kg biomass	125.19 \pm 4.14	0.002	30	135.7 \pm 4.19	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	151.12 \pm 5.54		60	154.59 \pm 5.91	
HSI	Control	1.08 \pm 0.03		0	1.23 \pm 0.04	
	0.5 g/kg biomass	1.12 \pm 0.04	0.014	30	1.2 \pm 0.03	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	1.23 \pm 0.03		60	1.01 \pm 0.03	
K	Control	2.72 \pm 0.03		0	2.79 \pm 0.02	
	0.5 g/kg biomass	2.74 \pm 0.03	0.62	30	2.81 \pm 0.05	<0.0001
	1.5 g/kg biomass	2.78 \pm 0.05		60	2.64 \pm 0.02	
ALT	Control	3.57 \pm 0.30		0	3.23 \pm 0.17	
	0.5 g/kg biomass	4.14 \pm 0.31	0.413	30	4.65 \pm 0.43	0.0073
	1.5 g/kg biomass	3.91 \pm 0.30		60	3.74 \pm 0.25	
AST	Control	55.32 \pm 7.56		0	41.57 \pm 4.09	
	0.5 g/kg biomass	66.11 \pm 7.56	0.195	30	74.97 \pm 10.79	0.01
	1.5 g/kg biomass	46.45 \pm 7.57		60	51.35 \pm 5.04	

HIS: hepatosomatic index; K: condition factor; ALT: Alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase.