

# ***Vibrio SPP. E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE LARVICULTURAS DE CAMARÕES MARINHOS***

*Vibrio* spp. and its bearing on marine shrimp larviculture

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira<sup>1</sup>, Teresa Cristina Vasconcelos Gesteira<sup>2</sup>, Lucas Cunha Marques<sup>3</sup>, Pedro Carlos Cunha Martins<sup>3</sup>, Célia Maria Monteiro<sup>3</sup>, Ricardo de Lima Carvalho<sup>3</sup>

## **RESUMO**

Foram realizadas análises microbiológicas para identificação do agente causador de mortalidade de larvas e pós larvas de camarão *Litopenaeus vannamei* numa larvicultura do Nordeste Brasileiro. Seis amostras constituídas de água dos tanques de cultivo, zoeas, náuplios e pós-larvas de camarão, cistos e náuplios de artêmia foram processadas em laboratório. As contagens padrão em placas (CPP) de bactérias aeróbias para água dos tanques de cultivo apresentaram valores de  $3,29 \times 10^5$  UFC/ml. Essas contagens foram menores do que as encontradas nas amostras de pós-larvas e zoeas de camarão e náuplios de artêmia, cujos valores estimados foram  $>10^6$  UFC /g da amostra. O NMP de *Vibrio* da amostra de água foi de 40/100 ml, enquanto que, para as demais amostras ultrapassou a 1.100 /100 g ( zoeas, pós-larvas e náuplios de artêmia). Os cistos de artêmia apresentaram valores para NMP de *Vibrio*  $< 10/100$ g. O lote Ia de cisto descapsulado de artêmia apresentou valores para CPP de  $1,76 \times 10^4$  UFC/g, enquanto os lotes Ib e II de cistos com córion mostraram um valor estimado  $<10^3$  UFC/g. Foram isolados das amostras: *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* e *Vibrio* spp. Testes de sensibilidade a antibióticos elegeram Ácido Nalidíxico e Cloranfenicol como os antibióticos mais eficientes no controle dessa vibriose.

**Palavras-chaves:** vibriose, larvicultura, *Litopenaeus vannamei*.

## **ABSTRACT**

Microbiological analyses were carried out at a larviculture facility in Northeastern Brazil in order to identify the agent causing increased mortality in larvae and postlarvae of the shrimp species *Litopenaeus vannamei*. Six samples were collected and processed from the different steps of culture process such as: water from the larviculture tanks, zoea, shrimp nauplii, shrimp postlarvae, cysts of artemia and nauplii of artemia, and subsequently studied. The standard plate counts (SPC) of aerobic bacteria performed with the water from the tanks yielded mean values of  $3,29 \times 10^5$  CFU/g. These values were lower than those obtained from the samples of postlarvae, zoea and nauplii of artemia ( $>10^6$  CFU/g). The MPN for *Vibrio* in the water sample was 40/100 ml while that for the remaining samples exceeded 1,100/100g (zoea, shrimp postlarvae and nauplii of artemia). The cysts of artemia had MPN values for *Vibrio* under 10/100g. Batch Ia, containing disencapsulated cysts of artemia, yielded SPC values of  $1.76 \times 10^4$  CFU/g, while batch Ib with chorion yielded an estimated  $<10^3$  CFU/g. Similar figures were obtained for batch II, also with chorion. The following strains were isolated from the samples: *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* and *Vibrio* spp. Susceptibility tests proved nalidixic acid and chloramphenicol to be the most effective antibiotics against this vibriosis.

**Key words:** vibriosis, shrimp larviculture, *Litopenaeus vannamei*.

<sup>1</sup> Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca e Pesquisador do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207, Fortaleza, CE 60165-081. E-mail: regpoema@labomar.ufc.br

<sup>2</sup> Professor Visitante do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. E-mail: gecmar@labomar.ufc.br

<sup>3</sup> Bolsistas-pesquisadores da Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) no Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. E-mail: gecmar@labomar.ufc.br

## INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão marinho teve início no Brasil, na década de 70, mas só começou a adquirir caráter empresarial no final da década de 80. Atualmente, o Nordeste é responsável por 95,6% da produção de camarão cultivado no Brasil, seguido das regiões Sul, Norte e Sudeste (Rocha & Maia, 1998).

A análise da expansão territorial da carcinicultura brasileira mostra que o setor vem apresentando expressivo crescimento. No período de 1992 a 1999 a área de engorda passou de 2.000 hectares para quase 7.000 hectares e a produção de pós-larvas em laboratório saltou de 200 milhões para 3 bilhões de pós-larvas/ano (Guerrelhas, 1999).

Esse quadro resultou do melhor conhecimento das técnicas de cultivo, aperfeiçoamento e melhoria de tecnologias de manejo operacional e da introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*, bem como o domínio do seu ciclo reprodutivo, além da disponibilidade de rações de boa qualidade. Dessa forma, a produção de 1998 (7.260 t) dobrou para 15.000 t. em 1999, acreditando-se que alcance 30.000 t. em 2000 (Rocha, 2000).

No momento, a espécie mais cultivada no Brasil é *L. vannamei* e por ser um crustáceo muito apreciado atinge altos valores de mercado tanto interno como externo, sendo comercializado como pós-larvas para povoamento de viveiros ou na sua fase adulta.

Um dos grandes problemas em cultivo de camarão, reside na ação patogênica de membros do gênero *Vibrio*. Estas bactérias são comuns ao ambiente marinho, podendo ainda ser encontradas no estômago, brânquias e cutícula de camarões selvagens e de cultivo, sendo que as doenças resultantes estão associadas a fatores estressantes (Lightner, 1993). Outras enfermidades infecciosas, nutricionais ou ferimentos também são apontados como responsáveis pela manifestação oportunista do *Vibrio spp* (Umbreit & Isaza, 1995).

O estresse é freqüentemente referido pelos epidemiologistas como um fator iniciante de doenças em cultivos de animais de um modo geral, sendo pouco entendido o seu mecanismo em provocar os processos patológicos (Thompson *et al.*, 1994).

O objetivo deste trabalho foi analisar um caso de mortalidade em uma larvicultura de camarão, isolar o agente causador e aplicar testes de antibiograma a fim de se eleger um antibiótico capaz de evitar sua proliferação. Também foram analisadas amostras da água de cultivo, bem como cistos de artêmia com córion e descapsulados, visando a verificar a influência do processo de descapsulação sobre a carga bacteriana dos cistos. Os antibióticos testados foram aqueles rotineiramente empregados na aquicultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

Seis amostras constituídas de água dos tanques de cultivo, zoeas, náuplios e pós-larvas de camarão e náuplios de artêmia foram enviados para análise, acondicionadas em sacos de polietileno de 15 L contendo água dos tanques de cultivo e oxigênio. Cistos de artêmia usados na larvicultura, chegaram ao laboratório desidratados e em recipiente, hermeticamente fechado. Uma das amostras (a de náuplios de camarão) não foi analisada, devido a mortalidade total, antes do seu processamento. Cada amostra, antes da pesagem e homogeneização, foi submetida a uma lavagem em água estéril com o objetivo de minimizar a influência da microbiota externa dos animais sobre os resultados.

As amostras foram homogeneizadas em geral, usando-se como solvente uma solução salina 0,85% estéril, na relação de 1:9. De todas elas foram feitas análises em duplicata. Uma repetição da amostra de pós-larvas foi processada seguindo uma metodologia diferente, que consistia na retirada de 25 indivíduos e maceração em solução salina 1:1, segundo Cevallos & Solis (1999). Para análise dos dois lotes de cistos de artêmia, foi utilizada metodologia semelhante àquela adotada para as larvas, entretanto um dos lotes foi dividido em duas subamostras que consistiram de cistos com córion e descapsulados. De todas as amostras foram feitas diluições até  $10^{-5}$  com a mesma solução salina usada para homogeneização e inoculado 1 ml, em triplicata, em água peptonada 1% + 3% de NaCl (pH 7,6). Dos tubos turvos, após 24 horas de incubação a 35°C, eram retiradas alíquotas e plaqueadas em Ágar Tiosulfato-Citrato-Sais Biliares-Sacarose (TCBS) Difco, segundo Twedt (1984). A amostra da água foi submetida as mesmas diluições acima descritas e além da sementeira em caldo peptonado, foi espalhada em Plate Count Agar - Difco (PCA) + 3% de NaCl, para teste de Contagem Padrão em Placas (CPP), de acordo com Messer *et al.* (1984). Após 48 horas de incubação a 35°C, procedeu-se a contagem das colônias crescidas no ágar PCA e o resultado foi expresso em UFC/ml.

Das colônias crescidas em TCBS, provenientes de todas as amostras, foram isoladas três (3) em Ágar Tripton Soja (TSA) Difco + 3% de NaCl e classificadas bioquimicamente segundo Twedt (*op. cit.*). Foram isoladas colônias sacarose positivas e negativas e então, aplicados os seguintes testes: coloração de Gram, oxidase, motilidade, tolerância ao NaCl 0%, 6%, 8% e 10% em água peptonada 1%, Voges Proskauer, crescimento a 43°C, bioluminescência, gás a partir de glicose e manitol, fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, manitol e arabinose), descarboxilação de ami-

noácidos (lisina, ornitina e arginina), fermentação/oxidação e ONPG.

Os resultados de cada teste foram lançados em um programa de computador, onde previamente havia sido processado um banco de dados dos *vibrios* implicados em processos patológicos na larvicultura de camarão marinho.

Os seguintes antibióticos foram testados, utilizando-se o método de sensibilidade a discos (CECON) segundo o NCCLS (1988): eritromicina EI (15 mcg), tetraciclina TT(30 mcg), ácido nalidíxico AN (30 mcg), cloranfenicol CO (30 mcg), sulfonamidas SF (300 mcg), ciproflaxacina CIP (5 mcg), penicilina G PN ou PEN (10 unidades) e nitrofurantoína NT (300 mcg). Como controle do antibiograma foi utilizada amostra de *E.coli* ATCC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens padrões em placas (CPP) de bactérias aeróbias para água dos tanques de cultivo apresentaram valores de:  $3,29 \times 10^5$  UFC/ml. Estes valores foram menores do que os encontrados nas amostras de pós-larvas e zoeas de camarão e náuplios de artêmia que foram estimados em  $>10^6$  UFC/g da amostra, sugerindo que a qualidade da água não foi o fator responsável pela mortalidade das larvas. Vale salientar, que o sistema de tratamento da água empregado na larvicultura, de onde vieram as amostras analisadas, se equivale aos encontrados nas mais modernas unidades mundiais. Entretanto, por não existirem padrões preestabelecidos para a contagem de vibrios, uma vez que o CONAMA (1986) recomenda apenas contagens de coliformes para a aquicultura, fica difícil uma avaliação com base nesse parâmetro. Deste modo, as contagens de bactérias aeróbias na água do cultivo, ficam apenas como um dado adicional para se especular se os filtros estariam funcionando, devidamente.

Confirmando a hipótese de que a água estaria satisfatória e de que os filtros estariam desempenhando a contento seus objetivos, o NMP de *Vibrio* desta água foi de 40/100 ml, enquanto que nas demais amostras ultrapassou a 1.100/100 g (zoea, pós-larvas e náuplios de artêmia). Os cistos de artêmia apresentaram valores para NMP de *Vibrio*  $< 10/100g$ .

Os valores de CPP nos lotes de cisto de artêmia também foram baixos. O lote 1 descapsulado apresentou  $1,76 \times 10^4$  UFC/g, enquanto que os lotes 1 e 2 com córion mostraram um valor estimado em  $<10^3$  UFC/g. Esses valores são esperados, uma vez que os cistos são desidratados e bactérias necessitam de umidade para se multiplicar.

As placas de TCBS semeadas a partir dos crescimentos em água peptonada apresentaram colônias

sacarose negativas e positivas, com predominância dessas últimas. As colônias isoladas de cada amostra de água, pós-larvas e zoeas de camarão e náuplios de artêmia foram classificadas como *Vibrio* spp., *V. alginolyticus*, *V.fluvialis* ( tabela I).

Tabela I – Cepas de *Vibrio* isoladas e identificadas a partir de amostras de água, pós-larvas e zoeas de camarão e náuplios de *Artemia* spp.

Amostras	<i>Vibrios</i> Identificados
Água	<i>V. alginolyticus</i> <i>Vibrio</i> spp.( Sac + e -)
Pós-Larva	<i>Vibrio</i> spp. <i>V. alginolyticus</i> <i>V. fluvialis</i>
Zoea	<i>V. alginolyticus</i> <i>Vibrio</i> spp.
Náuplios de <i>Artemia</i> spp.	<i>V. alginolyticus</i> <i>Vibrio</i> spp. ( Sac + e -)

Desde que se tem notícias de cultivo de pe-neídeos o *Vibrio* spp. tem sido a bactéria mais implicada em infecções e doenças relacionadas com esses camarões (Lightner 1988; Brock & Lightner 1990; Sindermann 1990).

Mortalidades significativas foram registradas em larviculturas de *Litopenaeus vannamei*, resultantes de vibrioses. As cepas isoladas apresentadas por ordem de frequência foram *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. damsela* (Lightner, 1993).

As vibrioses são associadas com outros problemas e, é possível afirmar que qualquer animal morto do meio marinho está comprometido por alguma vibriose. É relativamente fácil de ser detectada a sua presença, todavia, difícil é determinar a sua significância no problema de saúde. Por exemplo, em alguns casos os vibrios podem não ser a causa primária da mortalidade do camarão, estando presentes, oportunisticamente. Em outros casos pode ser mais patogênica e ser uma significativa causa de mortalidade (Chan-ratchakool *et al.*, 1995).

A amostra de água apresentou nas placas de TCBS um percentual de 67% de colônias de *Vibrio* spp. e 33% de *V.alginolyticus*.

Durante 1972 e 1973 vários casos de mortalidade ocorreram em larviculturas de camarão *Penaeus aztecus*

e *P.setiferus* aparentemente como resultado de uma doença, tendo causado a perda de poucos animais por dia, até 100% de todo o cultivo. Os resultados apontaram o *V. alginolyticus* como o organismo mais comumente isolado dos camarões afetados (Lightner & Lewis, 1975).

As amostras de pós-larvas, além de apresentarem *V.alginolitycus* (50%) dos isolados também revelaram a presença : de *V.fluivialis* (50%) enquanto que, nas de zoea e de náuplios de artêmia foram detectados 100% de *V.alginolyticus*.

Mohney *et al.* (1994) relataram uma epizootia acontecida em fazendas de camarão no Equador, onde os agentes causadores eram vibrios. Segundo os autores a vibriose atacou tanques de cultivo de larvas e de animais adultos, chegando, em alguns casos, a matar 90% dos indivíduos de um mesmo tanque. Os organismos predominantemente isolados e classificados como responsáveis pela doença, chamada "síndrome da gaivota" foram *V. parahaemolyticus*, *V.vulnificus* e *V.alginolyticus*.

O comportamento das cepas isoladas em relação aos antibióticos testados, está apresentado na Tabela II.

Tabela II - Sensibilidade das cepas isoladas aos antibióticos testados

Cepa	Comportamento	Antibiótico
	Sensível	EI, NA, CO, CIP, TT
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Intermediário	EI
	Resistente	SF, PN
	Sensível	NA, CO, TT, NT, CIP
<i>Vibrio fluivialis</i>	Intermediário	EI, TT, SF
	Resistente	PN
	Sensível	CO
<i>Vibrio spp.</i>	Intermediário	NT
	Resistente	EI, TT, CIP, PN, SF

De uma maneira geral, todas as cepas isoladas das amostras já citadas (com exceção de uma isolada de náuplios de artêmia, a qual teve um comportamento intermediário) foram sensíveis ao Ácido Nalidíxico e ao Cloranfenicol. Estes dados concordam com os de

Panchayuthapani (1997), quando analisando o comportamento de isolados de *Vibrio* spp. de larviculturas comerciais de várias regiões da Índia, frente a diferentes antibióticos, encontrou que a maioria deles era sensível ao cloranfenicol e não à tetraciclina, a qual é comumente usada naquele país.

Baticados *et al.* (1990) registraram mortalidades em larviculturas de camarão associadas aos *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. harveyi* e *V.splendidus*. Nas 24 provas de sensibilidade a antibióticos diferentes que os autores testaram, apenas cloranfenicol e os nitrofuranos (furazolidona, nitrofurazona, nitrofuratoín e perfuran) mostraram certa atividade inibitória. Este fato sugere que o controle químico de vibrioses em larvicultura é limitado devido a relativa eficácia dos antibióticos e ao desenvolvimento de cepas resistentes, além da baixa tolerância das larvas e pós-larvas a estas drogas (Umbreit & Isaza, 1995).

De acordo com Chythanya *et al.* (1999) os antibióticos têm desempenhado um importante papel no combate de doenças humanas e de animais aquáticos cultivados, no entanto o uso indiscriminado dessa importante arma na aquicultura, pode causar uma série de problemas futuros. Isto inclui toxicidade de alguns deles aos manuseadores dos animais, modificação na microbiota de consumidores devido aos antibióticos já presentes no alimento e transferência da resistência à droga aos patógenos humanos o que pode dificultar o tratamento das doenças no homem.

A patogenicidade do *Vibrio* spp. é muito variável. Não é possível se dizer qual espécie de *Vibrio* é mais ou menos nociva desde que a habilidade em causar doenças varia dramaticamente dentre as espécies. No entanto, em todos os casos, constata-se o estresse do camarão de alguma forma, na fase anterior ao desenvolvimento da vibriose. Por outro lado, é possível afirmar que as diferentes espécies de *Vibrio* detectadas no presente trabalho foram responsáveis pelo índice de mortalidade verificado na larvicultura estudada.

Uma vez instalada a vibriose, os tanques devem ficar em "estado de emergência". Após o uso da medicação, precisam ser realizadas avaliações freqüentes da condição da larva (mortalidade, comportamento natatório, resposta alimentar e aparência microscópica), além do monitoramento da temperatura, salinidade, oxigênio e nutrientes da água. O que tem sido observado é que uma agressiva prática de manejo como troca intensiva da água e adição de alimento fresco, a cada 6 ou 8 horas, podem fazer uma significativa diferença na redução de perdas por vibriose larval.

O uso de probióticos vem ganhando aplicabilidade na prevenção de vibrioses, trazendo benefícios

como potencial substituto dos antibióticos, tendo a vantagem de não poluir o ambiente, não gerar cepas resistentes e garantir o melhor crescimento de pós-larvas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baticados, M.C.L.; Cruz-Lacierda, E. R.; Cruz, M.C.; Duremdez-Fernandez, R.C.; Gacutan, R.Q.; Lavilla-Pitogo, C. R. & Lio-Po, G. D. Diseases of penaeid shrimps in the Philippines. *SEAFDEC Aquaculture Extension Manual*, Tigbavan, n. 16, p. 1-46, 1990.
- Brock, J.A. & Lightner, D.V. Diseases caused by microorganisms, p. 245-349, in O. Kinne (ed.), *Diseases of marine animals – Vol 3*. John Wiley & Sons, New York, 1990.
- Cevallos, F. & Solís, A. Técnicas para el diagnóstico de enfermedades bacterianas en camarones de cultivo. *Panorama Acuicola*, v.4, n.5, p. 28-30, 1999.
- Chanratchakool, P.; Turnbull, J. F.; Funge-Smith, S. & Limsuwan, C. Health management in shrimp ponds. Aquatic Animal Health Research Institute Department of Fisheries, Kasetsart University Campus, 111 p., Bangkok, 1995.
- Chythanya, R., Nayak, D. K., & Venugopal, M.N. Antibiotic resistance in aquaculture. *Infofish International*, v.6, p.30-32, 1999.
- CONAMA, Brasil. National Council of Environment. Resolution of CONAMA Nº 20, 1986.
- Guerrelhas, A. C. B.. Situação atual e perspectivas de produção de pós-larvas de *L. vannamei* no Brasil. *Revista da ABCC*, Recife, p. 8-11, 1999.
- Lightner, D.V. Diseases of cultured shrimp and prawns, p. 8-127, in Sidermann, C.J. & Lightner, D.V. (eds), *Diseases diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Elsevier, 1988.
- Lightner, D.V. Diseases of penaeid shrimp, p. 393-486 in McVey, J.P. (ed.), *Handbook of Mariculture. I - Crustacean Aquaculture*, CRC Press, 2<sup>nd</sup> edition Boca Ratón, 1993.
- Lightner, D.V. & Lewis, D.H. A septic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, v. 37, n. 25-28, 1975
- Messer, J. W., Peeler, J. T. & Gilchrist, J. E. Aerobic Plate Count, p. 401-410, in Read Jr, R. B.. (ed.), *Bacteriological analytical manual*. Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, Arlington., 1984.
- Mohney, L.L., Lightner, D. V., & Bell, T. A. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquac. Soc.*, v. 25, n. 1, p. 116-125, 1994.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobiol. Disk Susceptibility Tests. Approved Standards Vilanova. 18 M100-58, 1988.
- Panchayuthapani, D. A survey of shrimp diseases in India, p 225-232, in Flegell, T.W. & MacRae, I.H. (eds.), *Diseases in Asian aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 1997
- Rocha, I. P. & Maia, E. P. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira, p. 213-235, in *Anais do I Congresso Sul-Americano de Aqüicultura, X Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, V Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão*, Recife, 1998.
- Rocha, I. P. Agronegócio do camarão cultivado: uma nova ordem econômica-social para o litoral Nordeste. *Revista da ABCC*, Recife, p. 23-30, 2000.
- Sidermann, C. J. *Principal diseases of marine fish and shellfish, vol. 2*. Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition, 516 p., New York, 1990.
- Thompson, J. A.; Frelief, P. F. & Lawrence, A. L. Monitoring health and environment on US shrimp farms. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress of Animal Hygiene HP, p. 121-124, 1994.
- Twedt, R. M.. Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios, p. 1-8, in Read Jr, R.B. (ed.), *Bacteriological analytical manual*. Division of Microbiology, Center for Food and Drug Administration, Arlington, 1984.
- Umbreit, F. N. & Isaza, A. V. Principales enfermedades de camarones penaeidos en cultivo, p. 105-154, in Gomez, H.R., Romero, G.P. & Lara, O.M. (eds.), *Fundamentos de acuicultura marina*. Ministério de Aquicultura y Desarrollo Rural, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, p. 105-154, 1995.