

## VIBRIO EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE VIVEIROS DE CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO *LITOPENAEUS VANNAMEI*, NO CEARÁ-BRASIL

RENATA ALBUQUERQUE COSTA<sup>1,3,6</sup>, GUSTAVO HITZSCHKY FERNANDES VIEIRA<sup>2</sup>, REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA<sup>1,4</sup> & SILVANA SAKER SAMPAIO<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará – Instituto de Ciências do Mar. Avenida Abolição, nº 3207, Meireles, Fortaleza-Ceará, CEP: 60165-081 – Brasil. <sup>2</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral-Ceará; <sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado; <sup>4</sup>Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR); <sup>5</sup>Laboratório de Bioquímica Marinha, Departamento de Engenharia de Pesca; <sup>6</sup>renata.albuq@gmail.com

### RESUMO

Foram analisadas 24 amostras de água de viveiros de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará, Brasil. A pesquisa de diversidade de espécies de *Vibrio* foi realizada a partir da determinação do Número Mais Provável (NMP), isolamento e identificação fenotípica dos vibrios isolados. Os índices de NMP/100mL variaram de  $43 \times 10^4$  a  $11 \times 10^{13}$ . Dos 55 isolados de *Vibrio*, foram identificadas 7 espécies, com predominância de *V. cholerae* não O1/não O139 (21,8%), *V. harveyi* (20%), *V. parahaemolyticus* (16,4%) e *V. anguillarum* (12,8%).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Vibrio*, água, *Litopenaeus vannamei*.

### ABSTRACT

#### *Vibrio* in ponds of a shrimp farm rearing *Litopenaeus vannamei*, in Ceará-Brazil

The present study analyzed 24 samples of water from ponds of a shrimp farm in Ceará (Brazil) rearing *Litopenaeus vannamei*. *Vibrio* diversity was determined from the Most Probable Number (MPN) of vibrios, the number of isolated and phenotyped *Vibrio* strains. MPN values ranged from  $43 \times 10^4$  to  $11 \times 10^{13}$  MPN/100mL. The 55 *Vibrio* strains isolated belonged to 7 species: *V. cholerae* (21,8%), *V. harveyi* (20%), *V. parahaemolyticus* (16,4%) e *V. anguillarum* (12,8%).

**KEY WORDS:** *Vibrio*, water, *Litopenaeus vannamei*.

## INTRODUÇÃO

A ocorrência destacada de certas espécies de *Vibrio* em águas destinadas a cultura de organismos marinhos podem comprometer a qualidade do cultivo. Segundo a FAO (2001), o camarão cultivado nos países em desenvolvimento endêmicos de cólera pode apresentar risco da veiculação de *V. cholerae* O1 através da água onde é cultivado. Diante desse problema é necessária a investigação rotineira da qualidade bacteriológica nos ambientes de cultivo do camarão com destinação aos mercados interno e externo.

Por outro lado, Goarant *et al.* (1998) afirmam que os casos de vibrioses são um dos principais problemas da aqüicultura. De acordo com Aguirre-Guzmán *et al.* (2004), a carcinicultura mundial vem experimentando perdas significantes na produção provocadas por patógenos bacterianos do gênero *Vibrio*, especialmente na larvicultura e na engorda de camarões na fase de juvenil.

Os vibrios pertencem à flora autóctone do meio ambiente marinho, representando, portanto, uma fonte constante de possíveis infecções para o camarão. As bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* geram efeitos patológicos nos peneídeos, registrando-se, lesões nos tecidos com ou sem

necrose, retardo no crescimento e comprometimento das metamorfoses larvais, acompanhados por índices ou taxas de mortalidade variáveis. Citam-se *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. penaeicida*, *V. splendidus*, *V. damsela* e *V. harveyi* como as principais espécies reportadas como causadoras de infecções nos camarões de cultivo (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2002).

Segundo Vaseeharan & Ramasamy (2003), a presença de *V. parahaemolyticus* em corpos aquáticos destinados a cultura de camarões é preocupante uma vez que algumas cepas podem provocar doenças nos peneídeos. Além disso, a incidência dessa espécie de *Vibrio* na água pode contaminar a fauna e provocar doenças em humanos quando do consumo de alimentos contaminados. Daniels *et al.* (2000) relataram gastroenterites, infecções em feridas e septicemia como quadros clínicos de infecções provocadas por *V. parahaemolyticus* nos Estados Unidos.

A incidência de espécies de *Vibrio* de importância sanitária em alimentos de origem marinha destinados ao consumo humano vem sendo relatada no Brasil. Pereira *et al.* (2004) detectaram *V. parahaemolyticus* em amostras de moluscos bivalves marinhos comercializados no Rio de Janeiro (RJ) e identificaram cepas produtoras de urease e sorotipos

reconhecidos como patogênicos em casos de surtos de gastroenterites. Sousa *et al.* (2004) relataram a presença de *V. cholerae* não O1/não O139 em 33,3% das 300 amostras de ostras analisadas e oriundas de criadouro natural na cidade de Fortaleza (CE).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo a enumeração e pesquisa de espécies de *Vibrio* em amostras de água de viveiros destinados à cultura de peneídeos no Estado do Ceará, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 24 amostras de água de viveiros em dois ciclos de cultivo do *L. vannamei*. As amostragens foram realizadas com frequência quinzenal, no período de maio a outubro de 2005 (viveiro 1) e de junho a novembro de 2005 (viveiro 2), em uma fazenda de médio porte de cultivo de camarão marinho localizada no estuário do rio Coreaú, litoral oeste do Estado do Ceará, Brasil.

As amostras de água foram coletadas em vidros escuros previamente esterilizados com capacidade para um litro. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o início das análises, que não excedeu a 3 horas da coleta, e diluídas em solução salina a 0,85% até a diluição decimal de  $10^{-12}$ .

A determinação do NMP de *Vibrio* foi realizada de acordo com a técnica dos tubos múltiplos segundo Kaysner & DePaola (2004). Para a prova presuntiva (PP) foi inoculado 1mL de cada diluição decimal seriada em Água Peptonada Alcalina pH 8,5 (APA) contendo 1% de NaCl, com incubação a 35°C/24h. A prova confirmatória (PC) consistiu na semeadura de alíquotas dos tubos com crescimento (PP) em placas

de Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS).

Para a identificação das espécies de *Vibrio*, foram isoladas colônias sacarose negativas e positivas em tubos com ágar triptona soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação a 35°C/24h. As cepas puras foram submetidas à identificação fenotípica de acordo com as recomendações de Kaysner & DePaola (2004) e Alsina & Blanch (1994).

As variáveis ambientais pH, temperatura e salinidade foram obtidas *in loco* com emprego de potenciômetro (HANNA instruments pH211) e refratômetro manual (DIGIT modelo 211), respectivamente.

## RESULTADOS

O NMP de *Vibrio*/100mL variou de  $11 \times 10^6$  a  $11 \times 10^{13}$  e de  $23 \times 10^9$  a  $11 \times 10^{13}$  nos viveiros 1 e 2, respectivamente (Tabela 1). De acordo com o teste t de Student, o NMP de *Vibrio* da água dos dois viveiros é estatisticamente semelhante considerando-se  $\alpha = 5\%$  ( $p \geq 0,05$ ).

O pH variou de 6,94 a 9,59, no viveiro 1 (V1), e de 7,90 a 10,13, no viveiro 2 (V2). Das 24 amostras de água somente uma apresentou pH abaixo da faixa alcalina (Tabela 1). A oscilação da temperatura foi de 28,1 a 30,5°C, no V1, sendo de 29,1 a 30,9°C, no V2 (Tabela 1). A salinidade variou de 0,5 a 27‰ e de 0,5 a 39‰, nos viveiros 1 e 2, respectivamente (Tabela 1). Pelo teste estatístico t de Student, não houve variação nos valores de pH e temperatura nos dois viveiros.

Tabela 1 – Quantificação de *Vibrio* e determinação de variáveis ambientais em amostras de água de dois viveiros de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

Amostras	Viveiro 1					Viveiro 1				
	Meses	NMP	pH	T.	S.	Meses	NMP	pH	T.	S.
1	05	11 x 10 <sup>6</sup>	6,94	30,3	1	06	92 x 10 <sup>10</sup>	8,16	29,1	0,5
2	05	11 x 10 <sup>9</sup>	7,49	28,1	0,5	06	11 x 10 <sup>13</sup>	8,73	30,3	1
3	06	11 x 10 <sup>13</sup>	8,47	29,9	1	07	23 x 10 <sup>11</sup>	10,13	29,8	1
4	06	11 x 10 <sup>13</sup>	8,63	29,7	1	07	11 x 10 <sup>11</sup>	9,18	30,9	9
5	07	36 x 10 <sup>10</sup>	9,59	30,4	1	08	23 x 10 <sup>9</sup>	9,02	30,4	11
6	07	23 x 10 <sup>6</sup>	9,41	30,8	4	08	23 x 10 <sup>11</sup>	9,00	30,2	14
7	08	23 x 10 <sup>7</sup>	8,56	30,5	11	09	23 x 10 <sup>10</sup>	8,03	28,3	24
8	08	24 x 10 <sup>12</sup>	8,40	29,8	16	09	92 x 10 <sup>9</sup>	8,03	30,1	23
9	09	92 x 10 <sup>10</sup>	8,02	28,8	20	10	94 x 10 <sup>10</sup>	8,21	29,4	29
10	09	23 x 10 <sup>10</sup>	8,07	30,5	20	10	92 x 10 <sup>10</sup>	8,30	29,9	32
11	10	28 x 10 <sup>11</sup>	7,95	29,1	25	11	75 x 10 <sup>11</sup>	7,93	29,7	35
12	10	23 x 10 <sup>10</sup>	8,16	30,1	27	11	46 x 10 <sup>12</sup>	7,90	29,9	39

\* NMP= Número Mais Provável/100mL, T.= temperatura (°C), S.=salinidade (‰)

Dos 55 isolados de *Vibrio*, foram identificadas 7 espécies no V1 e 6 no V2. No V1 foram detectados *V. cholerae* não O1/não O139 (9), *V. harveyi*, (6) *V. parahaemolyticus* (6), *V. anguillarum* (1), *V. carchariae* (1), *V. fluvialis* (3), *V. mimicus* (1) e *Vibrio*

spp (3). No V2 foram observados *V. anguillarum* (6), *V. harveyi* (5), *V. cholerae* não O1/não O139 (3), *V. parahaemolyticus* (3), *V. carchariae* (3), *V. mimicus* (2) e *Vibrio* spp (3).

Tabela 2 – Identificação das 55 cepas de *Vibrio* isoladas de 24 amostras de água de dois viveiros de cultivo do *Litopenaeus vannamei*.

Espécies	Viveiros		Total n(%)
	1	2	
<i>V. cholerae</i> não O1/não O139	9	3	12 (21,8)
<i>V. harveyi</i>	6	5	11 (20)
<i>V. parahaemolyticus</i>	6	3	9 (16,4)
<i>V. anguillarum</i>	1	6	7 (12,8)
<i>V. carchariae</i>	1	3	4 (7,2)
<i>V. fluvialis</i>	3	-	3 (5,4)
<i>V. mimicus</i>	1	2	3 (5,4)
<i>Vibrio</i> spp	3	3	6 (11)

\*n= número de cepas, %=percentagem

## DISCUSSÃO

O CONAMA (2005), na Resolução 375, estabelece as diretrizes ambientais para o enquadramento dos tipos de água destinadas a cultivo, mas não contempla limite para víbrios em águas salobras e salinas destinadas à aquicultura. Desse modo, os resultados da presente pesquisa no que concerne à quantificação de víbrio não podem ser comparados a um padrão legal, impossibilitando a classificação dos valores em baixos ou elevados.

A variação dos índices de NMP/100mL entre as

amostras de água dos viveiros não foi significativa, indicando que os valores obtidos na quantificação bacteriana nos dois viveiros mantiveram-se muito próximos, provavelmente, devido ao fato de que as coletas foram realizadas no mesmo período, estando os viveiros sob as mesmas condições ambientais e de manejo.

Os índices de NMP/100mL das amostras de água de cultivo podem ser explicados pelo maior aporte de matéria orgânica no viveiro quando comparado as amostras de água ambientais, devido à oferta de rações e fertilizantes e, conseqüentemente,

ao aumento de detritos, plâncton e microbiota. Soma-se a isso uma alta densidade de organismos e condições ambientais favoráveis, o que concorre para a proliferação e manutenção de espécies de *Vibrio*. Segundo Alam *et al.* (2001), o suprimento de nutrientes pode levar a uma excessiva produção da biomassa primária, podendo favorecer o desenvolvimento de víbrios, uma vez que os produtos extracelulares do fitoplâncton estimulam a proliferação de bactérias (Riquelme & Avendaño-Herrera, 2000). De acordo com Moriaty (1997), os dois principais fatores para controlar o crescimento das bactérias nos viveiros são a concentração de substratos orgânicos e a temperatura.

As amostras de água dos viveiros do presente estudo apresentaram um índice de NMP de *Vibrio*/100mL com uma ordem de grandeza superior aos resultados determinados por Téllez *et al.* (1999), que em estudo sobre a qualidade da água e de ostras cultivadas no México, não detectaram *Vibrio* na água destinada ao cultivo.

As amostras analisadas apresentaram temperaturas com características tropicais compatíveis à presença e proliferação de víbrios. Nesse contexto, Matté *et al.* (1994) relataram índices elevados de NMP de *Vibrio* ao analisar víbrios patogênicos associados ao mexilhão *Perna perna* na costa do Brasil. Outrossim, Thompson *et al.* (2004) em pesquisa sobre a diversidade e dinâmica de comunidade de víbrio na costa do Atlântico Norte detectaram que a população de víbrio aumentou no verão onde as temperaturas alcançaram 30°C.

No que concerne à salinidade (Tabela 1), os menores valores foram observados nos meses de maio a julho (amostras 1 a 6 do V1 e 1 a 4 do V2), período que está sob influência dos índices de pluviosidade, ocorrendo diluição pelas águas pluviais. Os meses de agosto a outubro (amostras 7 a 12 do V1) e agosto a novembro (amostras 5 a 12 do V2) apresentaram os maiores valores de salinidade, essa época do ano é caracterizada pela ausência de chuvas e, conseqüentemente, intensa evaporação, o que concorre para o aumento deste parâmetro. Essa variação mostrou-se compatível com a presença de víbrios nas amostras de água de viveiro. Segundo Murakami *et al.* (1998), as espécies de *Vibrio* podem

ser encontradas em ambientes aquáticos com ampla variação de salinidade e representam o componente dominante das comunidades microbianas marinhas cultiváveis.

A presença de *Vibrio* nos viveiros está de acordo com os dados de Karunasagar & Karunasagar (2001), que em estudo sobre a comunidade bacteriológica associada ao cultivo de *Penaeus monodon*, na Índia, relataram uma proporção de espécies de *Vibrio* variando de 50 a 73% nos tanques de cultivo de larvas, e de 31% em amostras de água marinha.

Álvarez *et al.* (2003) relataram a presença de *Vibrio* spp (67%), *V. harveyi* (17%) e *V. carchariae* (17%) em amostras de água destinadas ao cultivo de peneídeos quando do estudo de casos de vibrioses em *Litopenaeus vannamei* e *L. stylirostris* em uma fazenda na costa ocidental da Venezuela. Os autores afirmaram que a diversidade de víbrios foi maior nas amostras de água onde camarões enfermos foram encontrados. Apesar de não terem sido detectados casos de vibriose na fazenda em estudo localizada no Ceará, chama-se a atenção para a diversidade de víbrios isolados da água destinada ao cultivo de camarões.

Gopal *et al.* (2005) em estudo sobre a ocorrência de espécies de *Vibrio* no cultivo de camarão na Índia revelaram a presença de 17 espécies isoladas de amostras de água com temperatura variando de 25 a 30°C e pH de 7,8 a 8,4. Os autores alertaram para a qualidade bacteriológica do camarão cultivado em águas ricas em víbrios, principalmente *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, causadores de gastroenterites em consumidores de camarões cultivados.

A elevada incidência de bactérias do gênero *Vibrio* pode ser indicativa de risco para a viabilidade do cultivo, desde que a imunidade dos organismos fique comprometida quando da instalação de condições ambientais adversas. Não havendo legislação específica no Brasil para concentrações de víbrios na água destinada a carcinicultura, não se pode precisar o índice de comprometimento do cultivo pela enumeração deste grupo bacteriano.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de Mestrado.

## LITERATURA CITADA

- AGUIRRE-GUZMÁN, G, R VÁZQUEZ-JUÁREZ & F ASCENCIO. 2002. Efecto de diferentes espécie de *Vibrio* sobre la sobrevivencia larval del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). *Panorama Acuicola*, 7(5):18-19.
- AGUIRRE-GUZMÁN G, HM RUÍZ & F ASCENCIO. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 35(15):1395-1404.
- ALAM, MJ, K TOMOCHIKA, S MIYOSHI & S SHINODA. 2001. Analysis of seawaters for the recovery of culturable *Vibrio parahaemolyticus* and some other Vibrios. *Microbiology and Immunology*, 45(5):393-397.
- ALSINA, M & AR BLANCH. 1994. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:719-721.
- ÁLVAREZ, RJD, C AGURTO, J OBREGÓN & L PEROZA, L. 2003. Detección de *Baculovirus penaei* y de casos de vibriosis em *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* en una granja de la costa occidental de Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ*, 13(4):255-262.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução nº357 de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, Brasil.
- DANIELS, NA, L MACKINNON, R BISHOP, S ALTEKRUSE, B RAY, RM HAMMOND, S THOMPSON, S WILSON, NH BEAN, PM GRIFFIN & L SLUTSKER. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5):1661-1666.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2001. Consultas de expertos ad hoc sobre la evaluación de riesgos asociados a los eligros microbiológicos em los alimentos. Identificación de peligros, evaluación de exposición y caracterización de peligros de *Campylobacter* spp en pollos para asar y *Vibrio* spp en mariscos. Oficina Central de la OMS, Ginebra, Suiza.
- GOARANT, C, F RÉGNIER, R BRIZARD & A-L MARTEAU. 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture*, 169(3-4):291-296.
- GOPAL, S, SK OTTA, S KUMAR, I KARUNASAGAR, M NISHIBUCHI & I KARUNASAGAR. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2):151-159.
- KARUNASAGAR, O & KARUNASAGAR. 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *Journal of Applied Ichthyology*, 17(2):59-63.
- KAYSNER, CA & A DEPAOLA JR. 2004. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html#authors>. Acesso em 10/01/2006.
- MATTÉ, GR, MH MATTÉ, MI SATO, PS SANCHEZ, IG RIVERA & MT MARTINS. 1994. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. *Journal of Applied Bacteriology*. 77(3):281-287.
- MORIATY, DJW. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151:333 – 349.
- MURAKAMI, K, H FUSE, O TAKIMURA, K KAMIMURA & Y YAMAOKA. 1998. Phylogenetic analysis of marine environmental strains of *Vibrio* that produce aerobactin. *Journal of Marine Biotechnology*, 6(2):76-79.
- PEREIRA, CS, CM VIANA & DP RODRIGUES. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(4):591-595.
- RIQUELME, CE & RE AVENDAÑO-HERRERA. 2000. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76:725-736.
- SOUSA, OV, RHSF VIEIRA, FGR MENEZES, CMF REIS & E HOFER. 2004. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(2):59-62.
- TÉLLEZ, SJ, M OLIVA, JA RAMÍREZ DE LÉON & A VÁZQUEZ. 1999. Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de "La Laguna Madre" de Tamaulipas (México). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2(3):152-157.
- THOMPSON, JR, MA RANDA, LA MARCELINO, A TOMITA-MITCHELL, E LIM, & MF POLZ. 2004. Diversity and dynamics of a north Atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied Environmental Microbiology*, 70(7):4103-4110.
- VASEEHARAN, B & P RAMASAMY. 2003. Abundance of potentially pathogenic microorganisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiological Research*, 158(4):299– 308.

Recebido: 31/10/2007

Aceito: 07/07/2009

