

## RESISTÊNCIA DOS CAMARÕES MARINHOS *LITOPENAEUS VANNAMEI* E *FARFANTEPENAEUS SUBTILIS* A INFECÇÕES POR *VIBRIO HARVEYI*

JOANA LYRA VOGEELEY, ROBERTA NERY, BRUNA DO VALLE, FREDDY VOGEELEY,  
JOSÉ VITOR LIMA, ROBERTA SOARES, SILVIO PEIXOTO

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Tecnologia em Aquicultura – LTA, Av. Dom Manoel Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife (PE), Brasil. CEP: 52171-900, joanavogeley@hotmail.com

### RESUMO

Nos camarões peneídeos, doenças causadas por bactérias do gênero *Vibrio* resultam em baixas taxas de sobrevivência nos sistemas de larvicultura, berçário e engorda. O objetivo desse estudo foi avaliar a resistência de juvenis de *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus subtilis* a uma infecção experimental pela bactéria *Vibrio harveyi*. Os camarões foram expostos por um período de 96 horas a três concentrações de *V.harveyi* inoculado diretamente na água: 103, 106 e 109 UFC mL<sup>-1</sup>, e um controle sem adição de *V.harveyi*. Três repetições foram usadas para cada tratamento. Para quantificação do total de *Vibrio* spp., foram coletadas amostras de água e de camarões de cada tratamento ao final do experimento. Não houve diferença significativa na sobrevivência do *L. vannamei* e *F. subtilis* quando comparado ao tratamento controle. Ambas as espécies apresentaram menor sobrevivência no tratamento 109 UFC mL<sup>-1</sup>, com 93% e 83%, respectivamente para *L. vannamei* e *F. subtilis*. Houve um aumento na concentração total de *Vibrio* nos camarões submetidos à maior concentração de *V.harveyi* (109 UFC mL<sup>-1</sup>). Os resultados sugerem que as concentrações da linhagem de *V.harveyi* utilizada não afetaram a sobrevivência dos camarões nesse estágio de vida durante o período avaliado.

**PALAVRAS CHAVE:** *Vibrio harveyi*, infecção, sobrevivência, *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus subtilis*

### ABSTRACT

#### Resistance of *Litopenaeus vannamei* and *Farfantepenaeus subtilis* to infection by *Vibrio harveyi*

In penaeid shrimp, diseases caused by *Vibrio* species are usually associated with low survival in larviculture, nursery and growth systems. The objective of this study was to evaluate the resistance of *Litopenaeus vannamei* and *Farfantepenaeus subtilis* juveniles to an experimental infection by *V.harveyi*. Shrimp were exposed during 96 hours to three concentrations of *V.harveyi* inoculated directly in the water: 103, 106 and 109 CFU mL<sup>-1</sup> and a control without addition of *V.harveyi*. Three replicates were used for each treatment. Samples of water and shrimp were collected from each treatment at end of the experiment to estimate *Vibrio* spp. counts. There was no significant difference in survival of *L. vannamei* and *F. subtilis* when compared to control. Both species had lower survival in the treatment 109 CFU mL<sup>-1</sup>, with 93% and 83%, respectively for *L. vannamei* and *F. subtilis*. There was an increase in the total concentration of *Vibrio* spp. in shrimp submitted to the highest concentration of *V.harveyi* (109 CFU mL<sup>-1</sup>) in the water. The results suggest that the concentrations of this *V.harveyi* strain did not affect shrimp survival at this life stage during the study period.

**KEYWORDS:** *Vibrio harveyi*, infection, survival, *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus subtilis*.

## INTRODUÇÃO

A partir da década de 80 houve a consolidação e o crescimento mundial do cultivo do camarão marinho, principalmente da espécie *Litopenaeus vannamei*, decorrentes do avanço de novas tecnologias de reprodução em cativeiro e larvicultura, assim como da crescente demanda do produto no mercado internacional (Rocha & Rodriguez 2004). Porém, a intensificação da carcinicultura vem sendo acompanhada pela ocorrência de doenças, destacando-se aquelas causadas por bactérias patogênicas oportunistas (Moriarty 1998; Gomez-Gil *et al.* 2000), as quais são frequentemente associadas com baixas taxas de sobrevivência em sistemas de larviculturas e engorda (Saulnier *et al.* 2000).

Entre as bactérias potencialmente patogênicas, as do gênero *Vibrio* tem sido as principais responsáveis por doenças e altas taxas de mortalidade em camarões cultivados (Baticados *et al.* 1990). Espécies como *Vibrio harveyi* podem infectar larvas, juvenis e adultos de camarões peneídeos (Gomez-Gil *et al.*

1998; Lavilla-Pitogo *et al.* 1998), comprometendo a cadeia produtiva. A abundância natural de *Vibrio* spp., assim como sua ubiquidade, taxa de multiplicação e habilidade para adaptar-se a mudanças ambientais em sistemas aquícolas, ressaltam a importância da avaliação de seus efeitos patogênicos em camarões cultivados (Saulnier *et al.*, 2000).

A domesticação de espécies selvagens de camarão e sua introdução bem sucedida na indústria da carcinicultura requerem um conhecimento profundo da biologia destas espécies, especialmente no que diz respeito à nutrição, reprodução e saúde (Brock & Main 1994). O camarão-rosa *Farfantepenaeus subtilis* é uma espécie nativa da costa norte e nordeste brasileira e que vem sendo considerada com potencial para a aquicultura nacional (Nunes *et al.* 1997). Logo, o conhecimento acerca da resistência desse camarão aos agentes patogênicos é de fundamental importância para o setor produtivo. No entanto, pouca informação está

disponível sobre o impacto de infecções bacterianas em camarões nativos de águas costeiras brasileiras. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* e *F. subtilis* quando expostos ao *V. harveyi*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os juvenis de camarões *L. vannamei* (0,25±0,06g) e *F. subtilis* (0,25±0,03g), foram obtidos em laboratórios comerciais nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte, respectivamente. Os indivíduos foram expostos por um período de 96 horas a três concentrações de *V. harveyi* inoculado diretamente na água, seguindo os seguintes tratamentos com três repetições cada: 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> Unidades Formadoras de Colônia mL<sup>-1</sup> (UFC mL<sup>-1</sup>) e um controle sem inóculo de *V. harveyi*. O *V. harveyi* utilizado para infecção da água das unidades experimentais foi obtido do banco de cepas do Laboratório de Camarões Marinhos – Setor Microbiologia, Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. A cepa de *V. harveyi* foi mantida em meio TSB (Triplic Soy Broth - HIMEDIA<sup>®</sup>) enriquecido com 2,0% de NaCl e acrescido de 30% de glicerol, e estocada em freezer a -80 °C no Laboratório de Sanidade dos Organismos Aquáticos – UFRPE.

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia em Aquicultura (LTA) da UFRPE. Foram utilizadas quatro unidades experimentais, correspondendo a cada tratamento, que consistiram de caixas plásticas com volume de 12L, aeração constante e temperatura ambiente. Em cada caixa foram distribuídos seis potes plásticos de 500 mL (subunidades) revestidos com tela de nylon (100 µm) como repetições de cada tratamento, sendo três para estocagem de *L. vannamei* e três para *F. subtilis*. Em cada subunidade foram estocados 10 camarões, totalizando 30 animais por espécie. A água utilizada no experimento foi previamente filtrada em malha de 0,1 µm e desinfetada com hipoclorito de sódio (20 ppm). Os indivíduos de ambas as espécies foram expostos à mesma concentração de *V. harveyi*, inoculado no volume total das unidades experimentais. Os camarões foram alimentados na proporção de 10% da biomassa duas vezes ao dia (manhã/tarde) com ração comercial com 35% de proteína bruta (Purina MR35).

O *V. harveyi* utilizado na infecção foi primeiramente cultivado em Caldo Cérebro-Coração (BHI) durante 24h em estufa (30 °C). Após esse período, foi efetuada a quantificação bacteriana da cultura através de diluições decimais seriadas (1/10) de uma amostra em solução salina estéril (2,5% NaCl). A partir de cada diluição, uma alíquota de 100 µL foi retirada para plaqueamento em Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e, após o período de incubação de 24h em estufa (30 °C), foi feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônia. Após a determinação do número de UFC mL<sup>-1</sup> dessa cultura de *V. harveyi*, a mesma foi diluída serialmente nas parcelas experimentais a fim de se obter as concentrações 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, conforme os tratamentos propostos. Diariamente, amostras de água foram coletadas de cada unidade experimental e semeadas seguindo o mesmo protocolo citado anteriormente, a fim de garantir a manutenção das concentrações bacterianas determinadas para cada tratamento.

A quantificação de *Vibrio* nos camarões foi realizada em ambas as espécies antes e após a exposição dos animais ao *V. harveyi*. Os indivíduos foram coletados diretamente das unidades experimentais, dispostos sobre uma peneira desinfetada e lavados com solução salina (2,5% NaCl) esterilizada para remoção das bactérias externas. Os animais foram pesados em balança analítica, macerados e em seguida um volume correspondente a dez vezes o peso dos animais (1:10, Peso:Volume) foi adicionado de solução salina estéril (2,5%) para perfazer a diluição 10<sup>-1</sup>. Posteriormente, a amostra foi diluída e semeada conforme descrito para análise de água.

Os valores de sobrevivência dos camarões e concentração de *Vibrio* spp. foram submetidos a análise de variância (ANOVA), levando em consideração as premissas necessárias, e ao teste de Tukey para verificar diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05).

## RESULTADOS

Os resultados de quantificação diária de *Vibrio* spp. da água dos diferentes tratamentos demonstraram que, durante as 96 horas experimentais, as concentrações mantiveram-se estáveis em cada

tratamento ( $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). As infecções por *V. harveyi* não resultaram em diferenças significativas na sobrevivência do *L. vannamei* e *F. subtilis* quando comparado ao tratamento controle. Entretanto, os camarões apresentaram menor sobrevivência no tratamento  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, com 93%

e 83%, respectivamente para *L. vannamei* e *F. subtilis* (Figura 1). Além disso, os camarões *L. vannamei* do tratamento  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> apresentaram uma sobrevivência superior do que aqueles mantidos sem a presença do *V. harveyi*.

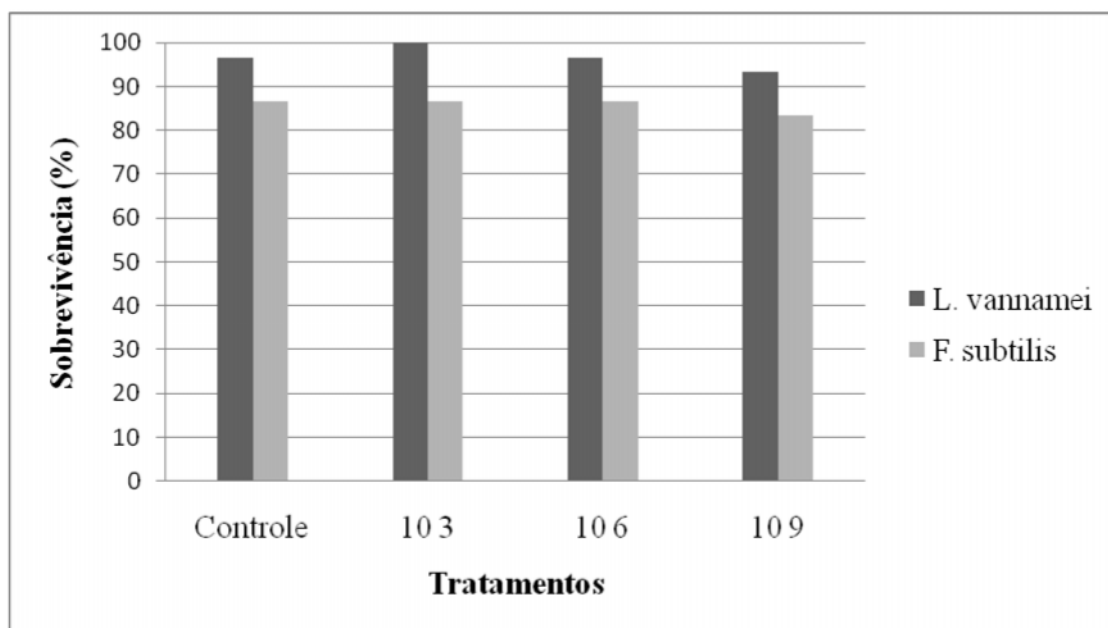


FIGURA 1 – Sobrevivência final do camarão *L. vannamei* e *F. subtilis* após infecção experimental por *V. harveyi* ( $10^3$ ,  $10^6$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) durante 96 horas.

A concentração inicial de *Vibrio* spp. nos juvenis de *L. vannamei* e *F. subtilis* foi de  $0,83 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> e  $2,60 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente. Observou-se uma tendência de aumento na concentração de *Vibrio* spp. nos camarões infectados com as concentrações mais elevadas de *V. harveyi*

( $10^6$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>), em relação aos valores iniciais. Os juvenis mantidos no tratamento com  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de *V. harveyi*, apresentaram concentração final de *Vibrio* spp. significativamente superior aos demais tratamentos (Tabela 1).

TABELA 1 – Média final ( $\pm$ DP) de *Vibrio* spp. nos juvenis de *L. vannamei* e *F. subtilis* expostos à infecção experimental por *V. harveyi* após 96 horas.

Tratamento	<i>L. vannamei</i> ( $10^6$ UFC g <sup>-1</sup> )	<i>F. subtilis</i> ( $10^6$ UFC g <sup>-1</sup> )
Controle	$3,00 \pm 0,85^a$	$1,10 \pm 1,72^a$
$10^3$ UFC mL <sup>-1</sup>	$2,72 \pm 1,03^a$	$2,84 \pm 0,82^a$
$10^6$ UFC mL <sup>-1</sup>	$5,36 \pm 1,79^a$	$4,48 \pm 1,39^a$
$10^9$ UFC mL <sup>-1</sup>	$1.800 \pm 600^b$	$3.400 \pm 860^b$

Letras diferentes entre tratamentos apresentam diferenças significativas (p 0,05).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, a exposição dos animais a diferentes concentrações de *V. harveyi* não causou diferenças na sobrevivência do *L. vannamei* e *F. subtilis* quando comparado aos camarões não expostos. De acordo com Muroga *et al.* (1994) e Karunasagar *et al.* (1994), a sobrevivência dos camarões depende do estágio de vida dos indivíduos, além da espécie, das concentrações e linhagem de *Vibrio* utilizadas. Estudos avaliando infecções de larvas de camarões peneídeos por diferentes linhagens de *V. harveyi* têm apontado resultados conflitantes (Soto-Rodríguez *et al.* 2006). Concentrações inferiores a  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> podem causar mortalidade de mais de 50 % em larvas de *L. vannamei*, enquanto outras linhagens não causam mortalidades em concentrações superiores a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (Prayitno & Latchford, 1995; Abraham *et al.*, 1997). Aguirre-Guzmán *et al.* (2001) estudaram o efeito de diferentes espécies de *Vibrio* sobre a sobrevivência larval de *L. vannamei* e observaram que todos os estágios larvais infectados com *V. alginolyticus* ( $10^5$  a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) tiveram uma sobrevivência significativamente maior que seus homólogos infectados por *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. penaeicida*. Nesse sentido, nossos resultados indicam que a linhagem utilizada neste experimento não influenciou na sobrevivência dos camarões infectados, durante esta fase do ciclo de vida e período avaliado.

Nossos resultados demonstraram que os juvenis de *L. vannamei* submetidos ao tratamento  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> apresentaram uma sobrevivência superior do que aqueles mantidos sem a presença do *V. harveyi*. Resultados semelhantes foram encontrados por Aguirre-Guzmán *et al.* (2002) quando os camarões *L. vannamei* nos estágios de Misis II-III e pós-larva (PL 1) expostos à concentração de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus* apresentaram melhor sobrevivência em relação ao grupo controle.

As bactérias do gênero *Vibrio* são patógenos oportunistas, sendo consideradas em muitos casos como agentes secundários de infecção. Fatores estressantes tais como falta de alimento, choques de salinidade, exposição a concentrações de amônia, ferimentos ou danos físicos podem funcionar como gatilhos para o desenvolvimento de doenças

causadas por *Vibrio* (Phuoc 2008). No presente estudo, a manutenção dos camarões em condições físicas e ambientais adequadas pode ter influenciado positivamente na sobrevivência dos mesmos frente às infecções testadas.

Observou-se uma tendência de aumento na concentração total de *Vibrio* dos camarões submetidos às maiores concentrações de *V. harveyi* inoculados na água. Por outro lado, Soto-Rodrigues *et al.* (2006) não encontraram nenhuma relação entre a concentração de bactéria inoculada na água e a quantidade de *Vibrio* encontrada nas larvas de *L. vannamei* durante 48h de infecção. Esses mesmos autores sugerem que quando o período de infecção experimental é mais extenso, as larvas são continuamente expostas às bactérias, possibilitando a colonização dos animais. Nossos resultados sugerem que a exposição contínua dos camarões às concentrações pré-determinadas de *V. harveyi* durante o período experimental (96 horas), contribuiu com o aumento da concentração total de *Vibrio* nos animais, sobretudo naqueles submetidos ao tratamento  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que as concentrações de *V. harveyi* (linhagem testada) não afetaram a sobrevivência dos camarões *L. vannamei* e *F. subtilis* durante o estágio de vida e período de exposição avaliado. Entretanto, considerando a inexistência de estudos neste tema com o camarão *F. subtilis*, recomenda-se futuras pesquisas enfocando as fases iniciais do ciclo de vida e larvicultura desta espécie.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. José Luiz Pedreira Mourino do Laboratório de Camarões Marinhos pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina pela doação da linhagem da bactéria *Vibrio harveyi* utilizada neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-GUZMÁN, G, R VÁZQUEZ-JUÁREZ, F ASCENCIO. 2002. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. Journal of Invertebrate Pathology, 78: 215-219.
- BATICADOS, MCL, CR LAVILLA-PITOGO, ER CRUZ-LACIERDA,

- LD DE LA PENA, NA SUNAZ. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Org*, 9: 133-139.
- BOYD, CE, L MASSAUT. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture Eng*. 20: 113-132.
- GÓMEZ-GIL, B, L TRON-MAYÉN, A ROQUE, JF TURNBULL, V INGLIS, AL GUERRA-FLORES. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of apopulation of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*.163: 1-9.
- GÓMEZ-GIL B, A ROQUE, JF TURNBULL. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259-270.
- KARUNASAGAR, I, R PAI, GR MALATHI, I KARUNASAGAR. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- LAVILLA-PITOGO, CRM, CL BATICADOS, ER CRUZ LACIERDA, LD DE LA PEÑA. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1-13.
- LAVILLA-PITOGO, CR, EM LEAÑO, MG PANER. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164: 337-349.
- MORIARTY, DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.
- MUROGA, K, K SUZUKI, K ISHIMARU, K NOGAMI. 1994. Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *J. World Aquacult. Soc.*, 25: 50-53.
- PHUOC, LH. Single and dual experimental infection of specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio* species. 2008. PhD thesis, Ghent University.
- ROQUE, A, JF TURNBULL, G ESCALANTE. 1998. Development of a bath challenge for the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Aquaculture*, 169: 283-290.
- SAULNIER, D, P HAFFTER, C GOARANT, P LEVY, D ANSQUER. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191: 133-144.
- SOTO-RODRÍGUEZ, SA, N SIMÕES, A ROQUE, B GÓMEZ-GIL. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, 258: 109-115.

Submetido: 17/08/2011  
Aceito – 15/02/2012

