

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CANDIDATAS A PROBIÓTICOS EM CAMARÕES DA ESPÉCIE *LITOPENAEUS VANNAMEI*

FRANCO, I.^{1*}; SANTANA, S. R. A.²; KREWER, C. C.³; COSTA, M. M.³; ALBINATI, R. C. B.⁴; BAGALDO, A. R.⁵

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar bactérias candidatas a probióticos do trato intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, em diferentes fases de desenvolvimento. Foram utilizados camarões nas fases de recria e inicial (pós-larva) e de crescimento (juvenil), os quais eram adaptados à água doce da Fazenda BAHIA PESCA, especializada em aquicultura, localizada no município de Santo Amaro/BA. Os animais foram enviados ao Laboratório de Bacterioses (UFBA) para retirada asséptica do trato intestinal, que foi semeado em tubos contendo APA e APT incubados a 25°C por 24 e 48 horas. Após esse período, por meio de uma alçada, foi realizada semeadura pela técnica de esgotamento por estrias, em placas de ágar Sangue, ágar TCBS e ágar TSA, que foram incubados em seguida a 25°C de 24 a 48 horas. As colônias bacterianas foram identificadas por meio de características morfológicas, tintoriais, bioquímicas e moleculares. Como resultados das seis coletas realizadas, foram identificados até então, cinco microrganismos com provável potencial probiótico: *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella* spp., *Aeromonas salmonicida* e *Bacillus* spp. Esses isolados encontram-se no presente momento em fase de avaliação, uma vez que para o desenvolvimento de um probiótico que seja utilizado na carcinicultura brasileira é importante conhecer a microbiota intestinal desses animais, e assim identificar bactérias que estejam presentes no intestino e que possam atuar benéficamente no hospedeiro.

Palavras-chave: bactérias, camarões, probióticos.

^{1*}Mestranda em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), CEP 40170-110, Salvador-BA, Brasil

e-mail: isafelinos@hotmail.com

²Estudante do Curso de Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), CEP 56300-990, Petrolina-PE, Brasil

³Professora Adjunta – UNIVASF – Rodoviária BR 407, Km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº, C1. CEP 56300-990, Petrolina – PE, Brasil

³Professores Adjunto I - UNIVASF – Rodovia BR 407, Km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº, C1. CEP 56300-990, Petrolina – PE, Brasil

⁴Professor Associado I - Universidade Federal da Bahia (UFBA) - Av. Ademar de Barros, 500 CEP 40170-110, Salvador-BA, Brasil

⁵Bolsista PRODOC – Universidade Federal da Bahia - Av. Ademar de Barros, 500 CEP 40170-110, Salvador-BA, Brasil

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAS POTENCIALLY PROBIOTICS IN SHRIMP OF THE SPECIES *LITOPENAEUS VANNAMEI*

ABSTRACT

The aim of this work was to isolate and identify possible probiotic bacteria in the gut of *Litopenaeus vannamei* species of shrimps in different phases of development. Shrimps in regrowth and initial stage of development (post-larvae) and growth stage (juvenile) were adapted to fresh water in the BAHIA PESCA Farm, an aquaculture center located at Santo Amaro, Bahia State, Brazil. The shrimps were carried out to Bacterial Diseases' Laboratory of Federal University of Bahia (UFBA) to aseptically gut extraction. The gut were distributed in test tubes having APA and APT, and incubated at 25°C by 24 and 48h. After that time, aliquots were streaked in agar-blood, agar-TCBS and agar-TSA plates, and incubated at 25°C by 24 and 48h. The bacterial colonies were identified by PCR and their morphological, biochemical and pigmentation characteristics. After six harvests and comparing the results of the microbiological culture and isolation with the PCR analysis, carried out at Microbiological Laboratory of the Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF) five microorganisms with probiotic potential were identified: *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella* spp., *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus* spp. In developing a probiotic to be used in shrimp production is important the knowledge of the gut microorganisms, so they may act positively in the hosts.

Keywords: bacteria, probiotic, shrimp.

INTRODUÇÃO

A carcinicultura é o segmento da aquicultura mais bem sucedido economicamente, gerando cerca de US\$ 6,1 bilhões, 12% do valor total gerado anualmente pela indústria aquícola mundial (MORAIS, 2002). A produção de camarão marinho cultivado tem crescido de forma contínua ao longo dos anos, sendo que o Brasil, em 2005, atingiu a produção de 65.000 toneladas e a Bahia é na ordem de 6.196 toneladas/ano (ABCC e BAHIA PESCA, 2006). Isso faz da carcinicultura nordestina uma atividade competitiva, capaz de trazer viabilidade econômica para o setor primário na região, remunerando o produtor, gerando divisas e empregos. No entanto, a ocorrência de doenças e o controle das mesmas na aquíicultura são entraves na produtividade e exigem, cada vez mais, uma abordagem efetiva e ambientalmente segura. O uso massivo de antimicrobianos para controle de doenças e promotores de crescimento em animais aumenta a pressão seletiva exercida sobre os microrganismos, levando naturalmente ao aumento da resistência bacteriana. Além disso, após a morte das bactérias não resistentes ao antibiótico, existe a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas a tais antibióticos (VERSCHUERE et al., 2000).

Diversas bactérias com efeito probiótico têm sido utilizadas no cultivo de camarões marinhos em substituição ao uso de antimicrobianos, com o objetivo de

promover a saúde dos animais. Estas bactérias podem ser adicionadas desde a forma direta na água até por meio de carreadores vivos, como artêmias e rotíferos. Os principais grupos de bactérias testados no cultivo de camarões, caranguejos, ostras e peixes têm sido dos gêneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Lactobacillus* (GOMEZ-GIL et al., 2000).

Na literatura, é possível encontrar estudos que identificam alguns microrganismos com ação probiótica que podem ser utilizados na criação de peixes em cativeiro, entretanto no que diz respeito à carcinicultura poucas são as pesquisas realizadas. Assim, esse trabalho teve como objetivo isolar e identificar algumas espécies de bactérias do intestino de camarões *Litopenaeus vannamei*, em diferentes fases de desenvolvimento, que possam ser aplicadas para este fim.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais experimentais

Para a realização desta pesquisa, foram feitas seis coletas de camarões cinza (*Litopenaeus vannamei*), na Fazenda BAHIA PESCA, especializada em aqüicultura, localizada no município de Santo Amaro/BA. Estes camarões, nas fases de recria e inicial (pós-larva) e de crescimento (juvenil), eram adaptados a água doce.

Coleta da amostras

A partir dos espécimes coletados foram obtidos os conteúdos digestivos por meio da remoção de todo o trato intestinal dos camarões após a desinfecção dos mesmos com álcool a 70%, cujo excesso foi removido por evaporação. O material obtido foi então encaminhado para o isolamento e identificação no Laboratório de Bacterioses (LABAC) da UFBA.

Isolamento e identificação

Para o isolamento dos microrganismos, o conteúdo intestinal foi semeado em diferentes meios de cultura. Para a identificação de vibrios foram utilizados tubos contendo APA (Água Peptonada Alcalina), para enterobactérias o meio de cultivo selecionado foi o APT (Água Peptonada Tamponada), ambos incubados a 25°C por 24 a 48 horas. Em seguida, uma alíquota retirada com alça de platina, foi semeada pela técnica de esgotamento por estrias, em placas de ágar Sangue, ágar TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrase) e ágar TSA (Tryptone Soya Agar), que foram incubados em seguida a 25°C por 24 a 48 horas.

A identificação das bactérias, após seu isolamento, foi realizada por meio de características morfológicas (identificação macroscópica e microscópica das colônias), avaliações tintoriais realizadas por coloração de Gram, leitura do TSI (Triple Sugar Iron Agar) e realização de provas bioquímicas (catalase, oxidase, citrato, mobilidade, uréia, manitol, glicose, sacarose, adonitol, lactose, malonato, vermelho de metila, indol, inositol, esculina, gelatina, redução de nitrato, lisina, arginina, ornitina e oxidação/fermentação), conforme Quinn et al. (1994).

As bactérias com perfil fenotípico de *Aeromonas* spp., foram submetidas à amplificação do DNA bacteriano no Laboratório de Microbiologia no Campus da

Fazenda Experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), no intuito de realizar a identificação da espécie bacteriana. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita segundo descrições de CHACÓN et al., 2003; KEYA, 2004; KEYA, 2005. Os produtos da PCR, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta foram comparados com padrões de peso molecular para confirmação da identidade dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos microrganismos foi realizada por meio das provas bioquímicas segundo Quinn et al. (19994). Foram isoladas cinco espécies de microrganismos: *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella* spp., *Aeromonas salmonicida* e *Bacillus* spp.

Este trabalho seguiu as descrições de Verschuere e colaboradores (2000), que consideram importante para o desenvolvimento de um probiótico efetivo, para qualquer sistema de produção de organismos aquáticos, a identificação de probiontes que seriam normalmente encontrados no ambiente aquático e no trato intestinal, considerando a complexidade de relações entre hospedeiro e habitat. Nossos achados também corroboram, com os descritos por Gomez-Gil et al. (2000) em dois dos gêneros de bactérias mais frequentemente encontradas na aquicultura, *Vibrio* e *Bacillus*.

O uso de espécies de *Vibrio* como probiótico é controverso, uma vez que este gênero integra inúmeras cepas patogênicas para o homem e para os animais. O uso de *Vibrio alginolyticus* como um probiótico foi recomendado para aumentar a sobrevivência e crescimento do camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*). Aparentemente este permitiu a exclusão competitiva de bactérias potencialmente patogênicas efetivamente reduzindo ou eliminando a necessidade da profilaxia antibiótica na larvicultura de sistema intensivo (GARRIQUES e AREVALO, 1995 apud GÓMEZ et al., 2007).

Porém, estudos prévios mostraram que *Vibrio parahaemolyticus* tem alguns genes importantes de virulência como *tdh*, codificando hemolisina termoestável (TDH); *trh*, codificando hemolisina de TDH-relacionando (TRH); e *tli*, codificando hemolisina termolábil (XIE et al., 2005). Investigações a partir de lesões externas e rins de 35 *Rhamdia quelen* permitiram a identificação dos gêneros *Vibrio* spp. (4%) e *Pasteurella* spp. (1%) como possíveis agentes patogênicos nos animais (SHAMA et al., 2000), o que não recomendaria o uso desses microrganismos como probióticos. Em outra pesquisa, na mesma espécie de peixe, McDaniel (1979) encontrou o gênero *Enterobacter* spp. como um potencial patógeno, em 2% dos animais avaliados, apesar da inexistência de outros relatos de doenças causadas por essa bactéria em peixes.

No presente estudo foram isoladas amostras de *Aeromonas salmonicida*. Este microrganismo já foi encontrado em peixes (JACOBS e CHENIA, 2007). O complexo *Aeromonas* agrega bactérias patogênicas importantes em peixes, causando infecções septicêmicas e perdas econômicas associadas ao cultivo mundial de peixes (COSTA e CYRINO, 2006). Membros do gênero *Aeromonas* pertencem a família *Aeromonadaceae* são bactérias anaeróbicas facultativas, bacilos gram negativos, encontrados em diversos ambientes, incluindo solo e água (NAM e JOH, 2007). Por muitos anos, a taxonomia da *Aeromonas* spp. foi

desconhecida e depois de significativas revisões, parece razoavelmente esclarecida.

O gênero *Bacillus* é um dos componentes da família *Bacillaceae*, abrange na atualidade mais de 60 espécies de bacilos gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem endosporos. Apesar de não serem consideradas bactérias autóctones, fato que poderia tornar inviável sua utilização como probiótico, muitos bacilos apresentam um ciclo de vida duplo, que envolve germinação de esporos, proliferação e re-esporulação sob condições adversas, o que lhes permite crescer e sobreviver no meio ambiente e no intestino de animais, sendo este ciclo a base do seu efeito probiótico (HONG et al., 2005). Não foram encontrados relatos que descrevam este gênero como patogênico para camarões *Litopenaeus vannamei*.

CONCLUSÃO

A partir das análises parciais, dos cinco gêneros encontrados, aparentemente o isolado de *Bacillus* spp. é um potencial probiótico. A determinação da atividade antimicrobiana deste isolado é fundamental à caracterização de um potencial probiótico para camarões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC e BAHIA PESCA, 2006.

COSTA, A. B.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Nota, **Sei. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, v.63, n.3, p.281-284, 2006.

CHACÓN, M. R.; FIGUERAS, M. J.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; SOLER, L.; GUARRO. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.269-278, 2003.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, p.259-270, 2000.

GÓMEZ, R. G. D.; BALCÁZAR, J. L.; SHEN, M.A. Probiotics as control agents in aquaculture. **Journal of Ocean University of China**, v.6, n.1, p.76-79, 2007.

HONG, A. H.; DUC, H. L.; CUTTING, M. S. The use of spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.813-835, 2005.

JACOBS, L.; CHENIA, H. Y. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. Isolated from south African aquaculture systems. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.114, p.295-306, 2007.

KEYA, S.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1077-1086, 2004.

KEYA, S. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. **Canadian Journal of Microbiology**. v.51, p.957-966, 2005.

McDANIEL, D. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Washington DC: American Fisheries Society: **Fish Health Section**, p.118, 1979.

MORAIS, L.C.L. Estudo para o cultivo, em gaiolas flutuantes, de camarão marinho *Litopenaeus vanammei* Boone, 1931 (Crustaceae, Decapoda, Penaeidae), em Guarapuá, Cairíu-BA. 2002. Monografia (Graduação). Instituto de Biologia da UFBA. Salvador. Disponível:<http://www.shrimp.ufscar.br/docs_pubs/GUIA.pdf>. Acesso em: 06 set. 2006.

NAM, I. Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, v.45, n.4, p.297-304, 2007.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. **Clinical veterinary Medicine**, London: Mosby-Year ed., p.648, 1994.

SHAMA, S.; BRANDÃO, D. A.; de VARGAS, A. C.; da COSTA, M. M.; PEDROZO, A. F. Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de Jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.293-298, 2000.

VERSCHUERE, L; ROMBAUT, G; SOGRECOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000.

XIE, Z. Y.; HU, C. Q.; CHEN, C.; ZHANG, L. P.; REN, C. H. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Applied Microbiology**, v.41, p.202-207, 2005.