

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

CLÁUDIA BRANDÃO VIEIRA

**RELAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO COM A QUANTIDADE DE *Vibrio*
NA HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* ORIUNDOS DE
TRÊS FAZENDAS DE CULTIVO DO ESTADO DO CEARÁ.**

FORTALEZA
2008

CLÁUDIA BRANDÃO VIEIRA

**RELAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO COM A QUANTIDADE DE *Vibrio* NA
HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* ORIUNDOS DE TRÊS
FAZENDAS DE CULTIVO DO ESTADO DO CEARÁ.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira.

FORTALEZA
2008

CLÁUDIA BRANDÃO VIEIRA

**RELAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO COM A QUANTIDADE DE *Vibrio* NA
HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* ORIUNDOS DE TRÊS
FAZENDAS DE CULTIVO DO ESTADO DO CEARÁ.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais .

Aprovada em 31 / 03 / 2008.

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (orientadora)
Universidade Federal do Ceará - Labomar

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará - Labomar
(membro interno)

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará - UECE
(membro externo)

*"A ciência da Natureza pressupõe sempre o homem
e não devemos esquecer que, no espetáculo da vida,
nunca somos apenas espectadores,
mas também, constantemente autores".*

Niels Bohr, (1885-1962) - Prêmio Nobel da Física em 1922.

*"É preciso provocar sistematicamente confusão.
Isso promove a criatividade.
Tudo aquilo que é contraditório gera vida".*

Salvador Dali.

"A imaginação é mais importante que o conhecimento".

Albert Einstein.

À minha mãe
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e amparo nos momentos mais difíceis dessa jornada. Nada seria concluído senão por auxílio de Deus. A TI SENHOR, MINHA ETERNA GRATIDÃO.

Aos meus pais, César e Rita de Cáscia, em especial a minha mãe por sempre se doar tão gentilmente a mim.

Ao meu irmão, Ricardo, a minha cunhada Adriana e aos meus sobrinhos, Tiago e Mateus, que sempre apostaram em mim e torcem pela minha felicidade.

A todos que compõem a minha turma de mestrado, só tenho a agradecer pelo que aprendi com cada um.

À Fernanda, pela amizade criada ao longo deste curso. ADMIRO MUITO VOCÊ.

À Samara, um dos bons frutos que colhi nessa passagem da minha vida. Não mereço tanto amor e carinho que me oferta. Obrigada por tudo.

À Carol, minha eterna amiga, pelo auxílio no início deste trabalho.

À Rakel, Fran e Danny, pela colaboração nas coletas.

Ao Carlos, minha imensa gratidão por ter me ajudado na identificação das cepas e principalmente pela paciência e gentileza que sempre teve por mim.

Ao Buda, pela execução do mapa e ainda mais por me demonstrar tanto afeto. Você enalteceu a minha vida de mestranda. Adoro você.

A minha amiga Rosa, por ser sempre tão presente em minha vida e também por ter me dado apoio nas horas que mais precisei.

Aos amigos do Labomar, Samara, Franzé, Dani, Edvar, Breno e Rachel e principalmente à Gardenny pelo apoio e amizade.

À Oscarina, por ter sido sempre tão atenciosa nas minhas indagações. Admiro-te pelo teu enorme senso ético e pela grande pesquisadora que és. Valorizar o ser humano é tão importante quanto compartilhar conhecimentos. Obrigada simplesmente por me considerar.

À Norma, um doce de pessoa. Sua dedicação servirá como exemplo para a minha vida profissional.

A todo grupo do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado.

A profa. Izabel, por aceitar gentilmente o convite para avaliação deste trabalho.

Ao meu grande amor, Sécio. Obrigada por sempre me incentivar a estudar mais e mais. Sua simples presença e companheirismo me tornam a mulher mais feliz do mundo. AMO VOCÊ.

Aos meus novos amigos de trabalho, Glauciane, Jamerson e Natália, que me apoiaram e me deram força para que eu conseguisse conciliar a vida acadêmica com o emprego.

À FUNCAP, pela concessão da bolsa de estudo em parte do curso.

À FINEP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profa. Regine, agradeço por ter me aberto as portas do mundo da Microbiologia, desde a minha graduação. Admiro muito a senhora. Sua inquietação no saber é fascinante e ainda mais a sua eterna vontade de ensinar. Faço minhas as palavras de D. Pedro II: "Se eu não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro."

À profa. Tereza Cristina pela co-orientação desta pesquisa e por ter sido pra mim, nesses anos de mestrado, mais do que uma simples professora. Por toda a sua atenção e carinho, muito obrigada.

À Camila, não tenho palavras para agradecer toda sua colaboração, tanto no profissional quanto no pessoal. Seu companheirismo fazia com que esta jornada passasse de forma prazerosa. Sem a sua ajuda, não teria conseguido chegar até aqui. Essa dissertação não é só minha.

Canção do camarão

Regine Limaverde

Meu sangue é diferente
dos sangues comuns.
Carrego, nas entranhas,
toda sujeira que
o homem joga no meio.
Meu sangue não é vermelho.
Não é um sangue igual
aos dos meus semelhantes,
É um sangue que assusta.
Não é tinto, não é bonito.
Meu sangue é uma linfa.
Desprotegida.
A qualquer hora
posso ser invadido.
Tudo depende do local
em que vivo.
Por que o homem não
atenta para o mal que
me faz?
Por que continua
poluindo meu *habitat*?
Um dia sua arma
se voltará para ele.
E aí será tarde como
é tarde para mim agora.

RESUMO

A maioria das infecções bacterianas em camarões é causada por bactérias do gênero *Vibrio*. Essas infecções quando instaladas chegam a provocar altos índices de mortalidade com perdas econômicas significativas nos países produtores. A ocorrência de bactérias na hemolinfa é um indicador de bacteriose generalizada. O presente estudo teve como objetivo relacionar o tempo de coagulação com a presença de *Vibrio* em amostras de hemolinfas de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em três fazendas localizadas no Estado do Ceará, entre o período de outubro de 2005 (seco) e outubro de 2006 (chuva). Foram realizadas 18 coletas, compreendendo uma estação chuvosa e outra de estio. Em cada coleta, foram analisados 10 exemplares de camarão com o tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias. O intervalo do tempo de coagulação da hemolinfa nas três fazendas e nos dois períodos variou de cinco a 55 segundos, nos 51 camarões que portavam *Vibrio* e para os 129 que não exibiram essa bactéria, o intervalo foi de quatro a 57 segundos. A Contagem Padrão em Placas (CPP) de *Vibrio* das hemolinfa de 51 indivíduos, das três fazendas de cultivo e nos dois períodos, variou de 10 a 28.000 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Para as fazendas A, B e C os intervalos das CPPs de *Vibrio*, tanto no período seco, quanto no chuvoso, foram, respectivamente, 1.000 e 10 a 140; 1.000 a 28.000 e 10 a 2.000; e 110 a 1.000 e 10 a 1.605 UFC/mL na hemolinfa. Das 132 cepas isoladas das hemolinfas dos camarões portadores de *Vibrio*, foram identificadas 13 espécies deste gênero. A maior diversidade de víbrios nas três fazendas foi detectada por ordem decrescente, B, C e A. O período chuvoso favoreceu a contaminação das hemolinfas infectadas com *Vibrio*. A presença da bactéria na hemolinfa não teve relação com o seu tempo de coagulação.

Palavras-chave: Hemolinfa, Tempo de coagulação, *Vibrio*.

ABSTRACT

Most of the time, shrimp infection by bacteria is mainly caused by *Vibrio*. These kinds of infections can bring about high level of mortality with significant economic damages in shrimp-producing countries. When bacteria are located in haemolymph, it indicates a general bacterial infection. The purpose of the present study is to relate coagulation time with *Vibrio* presence in the haemolymph of shrimps reared in three farms located in Ceará State, from October, 2005 (dry period) to October, 2006 (rainy period). In all, 18 samples were withdrawn, in each of which 10 shrimps were analyzed. The cultivation time of the experiment varied from 60 to 120 days. The intervening time of haemolymph coagulation in the farms and in both periods varied in the range of 5 - 55 seconds, in the 51 shrimps infected with *Vibrio* and, for the remaining ones (129) not infected, the intermission time ranged from 4 to 57 seconds. The Plate Standard Counting (PSC) of *Vibrio* in haemolymph referring to 51 individuals varied from 10 to 28.000 Colony-Forming Units (CUF/mL). For the farms A, B and C the intervening times of *Vibrio* PSC in haemolymph in the dry period were, respectively, 1,000, from 10 to 140, and from 1.000 to 28.000; for the rainy period, they varied from 10 to 2,000, from 110 to 1,000 and from 10 to 1,605 CFU/mL. Out of 132 isolated strains of the shrimp haemolymph which contained *Vibrio*, 13 species were identified. The highest diversity of *Vibrio* was observed in the following decreasing order of the farms, namely B, C and A, and also that haemolymph contamination was mostly favoured by rainfall. No relationship was found to exist between bacterian presence in the haemolymph and coagulation time.

Key words: haemolymph, coagulation time, *Vibrio*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa de localização das fazendas A, B e C (CE) de onde foram coletadas amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> nos períodos de estio e chuvoso	12
FIGURA 2: Teste de coagulação da hemolinfa	13
FIGURA 3: Extração da hemolinfa	14
FIGURA 4: Fluxograma da análise bacteriológica da hemolinfa	15
FIGURA 5: Gráficos referentes à Contagem Padrão em Placas (CPP) de vibrios por mililitro de hemolinfa obtida das amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , cultivados na fazenda A, no período de outubro/05 a agosto/06, com tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias	29
FIGURA 6: Gráficos referentes à Contagem Padrão em Placas (CPP) de vibrios por mililitro de hemolinfa obtida das amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , cultivados na fazenda B, no período de outubro/05 a agosto/06, com tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias	30
FIGURA 7: Gráficos referentes à Contagem Padrão em Placas (CPP) de vibrios por mililitro de hemolinfa obtida das amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , cultivados na fazenda C, no período de outubro/05 a agosto/06, com tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias	31
FIGURA 8: Distribuição, em porcentagem, dos 105 isolados de <i>Vibrio</i> oriundos das amostras de hemolinfas dos camarões (<i>Litopenaeus vannamei</i>) cultivados nas três fazendas, nos períodos seco e chuvoso	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estimativas na Contagem Padrão em Placas (CPP) de <i>Vibrio</i> por mililitro de hemolinfa obtidas das amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , cultivado na fazenda A, localizada no município de Granja-CE, no período de outubro/05 a outubro/06	22
TABELA 2: Estimativas da Contagem Padrão em Placas (CPP) de <i>Vibrio</i> por mililitro de hemolinfa obtidas das amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , cultivado na fazenda B, localizada no município de Acaraú-CE, no período de outubro/05 a outubro/06	23
TABELA 3: Estimativas na Contagem Padrão em Placas (CPP) de <i>Vibrio</i> por mililitro de hemolinfa obtidas das amostras de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , cultivado na fazenda C, localizada no município de Aracati-CE, no período de outubro/05 a setembro/06	24
TABELA 4: Espécies de <i>Vibrio</i> isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (<i>Litopenaeus vannamei</i>) cultivados na fazenda A, durante os períodos seco e chuvoso	33
TABELA 5- Espécies de <i>Vibrio</i> isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (<i>Litopenaeus vannamei</i>) cultivados na fazenda B, durante os períodos seco e chuvoso	34
TABELA 6: Espécies de <i>Vibrio</i> isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (<i>Litopenaeus vannamei</i>) cultivados na fazenda C, durante os períodos seco e chuvoso	35

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1–Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	4
2.1.1 - Sistema circulatório do <i>L. vannamei</i>	5
2.1.2 – Sistema imunológico	5
2.2 – <i>Vibrio</i>	6
2.2.1 – Vibrioses em camarão	8
2.3 – Principais víbrios patogênicos	9
2.3.1 – <i>Vibrio alginolyticus</i>	9
2.3.2 – <i>Vibrio harveyi</i>	10
2.3.3– <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
2.3.4 – <i>Vibrio vulnificus</i>	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 – Locais de coleta	12
3.2 – Processamento das Amostras	13
3.2.1 - Teste de coagulação da hemolinfa	13
3.2.2 – Extração da hemolinfa	14
3.3 – Contagem e Isolamento de <i>Vibrio</i> spp.	14
3.3.1 – Semeadura Inicial das amostras	14
3.3.2 – Contagem e Isolamento de Colônias Suspeitas	16
3.4 - Identificação Morfológica e Bioquímica das Espécies de <i>Vibrio</i> spp	16
3.4.1 - Coloração de Gram	16
3.4.2 – Motilidade	17
3.4.3 - Identificação bioquímica de cepas de <i>Vibrio</i> spp.	17
3.4.3.1 - Prova de Produção de Citocromo-Oxidase	17
3.4.3.2 - Produção de Indol	17
3.4.3.3 - Prova do Voges-Proskauer	18
3.4.3.4 -Tolerância ao NaCl	18

3.4.3.5 - Fermentação de Carboidratos	18
3.4.3.6 - Hidrólise da Arginina e Descarboxilação de Lisina e Ornitina	19
3.4.3.7 - Prova do ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo).....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
7. ANEXOS.....	56

Relação do tempo de coagulação com a quantidade de *Vibrio* na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* oriundos de três fazendas de cultivo do Estado do Ceará.

Cláudia Brandão Vieira

1 - INTRODUÇÃO

A atividade de cultivo de camarão é um dos segmentos da aquicultura que mais se destacam no contexto do setor pesqueiro mundial. O camarão é o produto mais importante nesse cenário. As importações em 2003 chegaram a 1,8 milhões de toneladas (MADRID, 2005).

Os números do desempenho da carcinicultura são bastante expressivos, e segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), no ano de 2007, a produção desse setor cresceu de 917.273 toneladas, em 1996, para 2.733.134 toneladas em 2005, correspondendo a um incremento médio de 13,38% ao ano, representando 45% da produção mundial de camarão, que é de 6.082.600 toneladas. Já a produção extrativa, nesse mesmo período, teve um acréscimo de apenas 3,44% ao ano, saindo de 2.522.122 toneladas, em 1996, para 3.349.346 toneladas, em 2005 (ROCHA; ROCHA, 2007).

No Brasil, o crescimento da aquicultura, particularmente a criação de camarões marinhos, tem-se destacado nos últimos anos. Este aumento é reflexo dos avanços tecnológicos do setor, estimulados pela grande demanda mundial por frutos do mar (ZANOLO, 2006). Na América Latina, o Brasil é considerado como o segundo maior mercado de camarão e consumiu 46,5 mil toneladas em 2005, o que é uma vantagem em comparação aos outros países que não contam com um mercado interno (CARVALHO et al., 2007).

Mesmo possuindo uma área de produção considerada baixa em relação aos outros principais produtores mundiais, o Brasil possui uma alta produtividade, 4.333 kg/ha/ano, abaixo apenas da Tailândia. Em 2005 chegou a produzir 65.000 toneladas de camarão cultivado em 15 mil hectares (BNDES, 2006).

Na região Nordeste do Brasil, a carcinicultura marinha já se constitui como uma das mais importantes atividades econômicas nos Estados do Rio Grande do Norte,

Ceará, Pernambuco, Bahia, Piauí e Paraíba. Em 2003, ocupou a segunda posição nas exportações desse setor e participou com 54,51% das receitas decorrentes das exportações do setor pesqueiro brasileiro (ROCHA, 2005).

Um dos principais pontos de destaque desse atual desenvolvimento é a espécie *Litopenaeus vannamei*, originária do Pacífico. Esta espécie, introduzida no país, na metade dos anos 80, possui excelentes condições zootécnicas, tais como: rápido crescimento, rusticidade e habilidade de converter dietas artificiais em excelentes ganhos de peso. No final do século passado, essa espécie, praticamente, passou a ser cultivada em 100% das fazendas brasileiras (MARTINS, 2003).

Apesar dos resultados otimistas, percebe-se que em escala mundial há uma desaceleração desse setor produtivo. Essa situação é atribuída principalmente a uma degradação do meio ambiente, a um manejo inadequado das operações de cultivo e às perdas na produção ocasionadas por enfermidades (HERNANDEZ, 2000).

Doenças infecciosas estão sendo cada vez mais responsáveis por perdas significativas no cultivo de organismos aquáticos e afetam diretamente o desenvolvimento econômico do setor em vários países. Essas doenças estão sendo consideradas como um fator limitante na produção de camarão (VERSCHUERE et al., 2000).

A maioria das infecções bacterianas em camarões é causada por bactérias do gênero *Vibrio* (JIRAVANICHPAISAL et al., 1993). Nos últimos anos, essas enfermidades estão se tornando mais recorrentes e prejudiciais, podendo gerar mortalidades de cerca de 100% nos estoques afetados (ALVIDRÉZ, 2003).

Os víbrios, agentes causais de bacterioses, compõem a microbiota dominante nos estágios de desenvolvimento larval dos camarões, sendo também isolados de animais saudáveis. Esse fato comprovaria a característica oportunista dos microrganismos associados aos camarões (MENEZES, 2005).

A ocorrência de bactérias na hemolinfa é um indicador de bacteriose generalizada, uma vez que a hemolinfa deve ser, se não estéril, pelo menos, pouco contaminada (LIGHTNER, 1977). No entanto, existem relatos de que camarões sadios podem abrigar víbrios em sua hemolinfa (GOMEZ-GIL et al., 1998).

A partir das informações acima, o presente estudo teve como objetivos:

1. Aplicar o teste de coagulação em hemolinfa do camarão cultivado *Litopenaeus vannamei*, nos estágios juvenil e adulto, em três fazendas no Estado do Ceará.

2. Quantificar, isolar e identificar fenotipicamente as colônias de vibrios sacaroses positivas e negativas nas amostras extraídas da hemolinfa dos camarões.

3. Comparar o tempo de coagulação com o aparecimento de *Vibrio* nas amostras de hemolinfas dos camarões.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1–Camarão *Litopenaeus vannamei*

O filo Arthropoda (gr. *artros*, articulação: *podos*, pé) é composto por animais que possuem exoesqueleto e apêndices articulados. Dentre os diferentes tipos de artrópodes, podemos encontrar os camarões, que pertencem ao grupo dos Crustacea (lat. *crusta*, carapaça dura). A ordem Decapoda (gr. *deca*, dez; *podos*, pés) é formada por crustáceos altamente organizados, tendo como exemplo, lagostas e caranguejos (NARCHI, 1973).

O tipo de família é definido pela forma de fecundação dos decápodas. Os animais que liberam os seus ovos diretamente na água, são classificados como pertencentes à subordem Dendobranchiata, incluindo os decápodas que compõem a família Penaeidae (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

Um dos representantes da família é o *Litopenaeus vannamei*, também conhecido como camarão branco do Pacífico (NUNES, 2002). Possui distribuição natural no Pacífico leste, desde o Golfo da Califórnia até o norte do Peru. Habita lagoas costeiras que possuem abertura para o oceano, com profundidades que podem chegar até a 70 metros (PEREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997).

Seu ciclo de vida natural inicia-se em um estágio larval planctônico no oceano. Logo em seguida, no estágio juvenil (pós-larva), o camarão branco possui como *habitat*, os estuários. Na fase adulta, ele retorna ao oceano para amadurecer e reproduzir (VALLES-JIMENEZ et al., 2004).

Durante a reprodução, o macho fertiliza a fêmea com o espermatóforo em seu télico. Se fertilizada, uma fêmea dessa espécie pode chegar a produzir cerca de 100.000 a 250.000 ovos, correspondendo a uma biomassa de 30 a 45g de ovos, com diâmetro aproximado de 0,22mm, que eclodem como náuplios, 14 horas após a desova. O seu período larval se constitui em nove fases: seis como náuplio, três como protozoa e três como misis. Na fase de pós-larva pode chegar a medir 0,88 a 3,00 mm de comprimento (KITANY, 1993).

L. vannamei apresenta, em geral, taxa de crescimento uniforme e fácil adaptabilidade a diferentes condições físico-químicas do meio, como por exemplo: salinidade e temperatura. Seu comprimento final pode chegar a 230 milímetros (LOTZ, 1997).

Nos dias atuais, a produção de camarão em cativeiro no Brasil está concentrada nessa espécie que, confirmando as expectativas, adaptou-se muito bem ao clima brasileiro, principalmente ao da região Nordeste (ROCHA, 2000).

2.1.1 - Sistema circulatório do *L. vannamei*

Nos camarões, como nos demais crustáceos, o sistema circulatório é classificado como aberto ou semi-aberto, e se distribui entre os tecidos sem o auxílio de veias. É semelhante ao dos outros artrópodos e contrasta nitidamente com o sistema circulatório fechado de anelídeos e vertebrados. Embora as paredes arteriais não tenham tecido muscular, são sustentadas por fibras colágenas e elásticas, e podem funcionar até um certo grau como reservatórios de pressão (RUPPERT; BARNER, 1996).

O plasma sanguíneo dos camarões, quase incolor, denominado de hemolinfa, contém um pigmento respiratório dissolvido (hemocianina), que transporta oxigênio para os tecidos (STORER et al., 2000). Na hemolinfa são transportados continuamente nutrientes, excretas, oxigênio, hormônios e outras moléculas importantes para os diferentes órgãos desses animais. Embora ainda haja divergência entre diversos autores quanto à classificação das células circulantes da hemolinfa, também denominadas de hemócitos, pode-se descrevê-las em três tipos: hemócitos-hialinos, hemócitos semigranulares ou com grânulos pequenos e hemócitos-grandes ou com grânulos grandes (JOHANSSON et al., 2000). Essas células parecem estar envolvidas na coagulação da hemolinfa dos camarões (DURLIAT, 1985; AONO; MORI, 1996).

2.1.2 – Sistema imunológico

Além da cutícula rígida, que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos, a integridade corpórea dos crustáceos é mantida pelo seu sistema imunológico. Assim como outros invertebrados, os crustáceos contam apenas com um sistema imune inato ou natural, diferentemente dos vertebrados, que possuem além deste, um sistema adaptativo ou adquirido (BARRACO, 2007).

Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos crustáceos são: (1) coagulação da hemolinfa; (2) melanização mediada pelo sistema pro-fenoloxidase; (3) reconhecimento e aglutinação celular mediada por lectinas; (4) sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais mediados por peptídeos, RNA de interferência e por proteínas de reconhecimento padrão; (5) produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio; e sistema fagocítico e de encapsulamento. Todos os componentes do sistema imunológico estão contidos na hemolinfa, isso se deve ao fato dela ser altamente fluída e também por ser capaz de atingir diretamente todos os tecidos dos crustáceos (IWANAGA; LEE, 2005).

Para uma melhor compreensão do sistema imunológico dos crustáceos, vários parâmetros estão sendo cada vez mais estudados. É possível que haja grande variabilidade nos valores de referências desses parâmetros, mesmo dentro de uma mesma população, sexo e estágio de desenvolvimento. Os parâmetros hematoimunológicos mais comumente empregados são: (1) hemogramas (contagem total e diferenciação de hemócitos); (2) coagulação da hemolinfa; (3) atividade da enzima PO (fenoloxidase); (4) índice fagocítico; (5) produção de ROI'S (espécies intermediárias reativas de oxigênio); (6) atividade antimicrobiana; (7) título hemaglutinante do plasma e (8) concentração de proteínas totais na hemolinfa (BARRACCO et al., 2007).

Dentre os parâmetros acima citados, as alterações mais evidentes em animais (principalmente camarões) infectados/estressados referem-se à modulação do número total de hemócitos e a diminuição da capacidade coagulante da hemolinfa (LIGHTNER, 1996; LEE et al., 1999). É bem conhecido, na prática de cultivo, o aumento no tempo de coagulação da hemolinfa em crustáceos sobre estresse fisiológico ou durante infecções (JUSSILA et al., 2001).

O processo de coagulação da hemolinfa envolve vários fatores: a proteína de coagulação; a enzima hemocitária TGase e a concentração plasmática de Ca^{2+} . Não se sabe ainda ao certo qual destes fatores é o responsável pelo aumento no tempo de coagulação em animais estressados/infectados. Contudo, estudos recentes sugerem que haja uma interação desses fatores (SONG et al., 2003).

2.2 – *Vibrio*

Em 1854, o médico italiano Filippo Pacini descobriu a primeira espécie de vibrio, a qual foi denominada de *Vibrio cholerae*, agente causador da Cólera, quando

ocorreu um surto desta doença em Florença (THOMPSON et al., 2004). O gênero *Vibrio* é constituído por bacilos Gram–negativos curvos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, geralmente halodependentes, ou seja, requer para o crescimento a presença obrigatória, em maior ou menor concentração, de cloreto de sódio. São móveis, e a maioria apresenta um flagelo polar em meio líquido. Possuem as enzimas oxidase (exceto *V. metschnikovii* e *V. gazogenes*) e catalase e fermentam a glicose sem produção de gás (WEST, 1989; ALSINA; BLANCH, 1994).

São considerados também como bactérias caracteristicamente indígenas de ambientes marinhos, costeiros e estuarinos (HERVIO-HEATH et al., 2002). Entretanto, podem ser também encontrados em ambientes de água doce (SHEHANE; SIZEMORE, 2002).

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* cresce em uma vasta quantidade de meios de cultura simples, dentro de uma ampla faixa de temperatura (de 18 a 37 °C) (MURRAY et al., 2004). O ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) é provavelmente o meio mais amplamente usado para o isolamento de víbrios. O TCBS, disponível comercialmente, tanto é utilizado para amostras clínicas como para análises de alimentos e de água. A fermentação da sacarose é o aspecto diferencial desse meio de cultura. A produção de ácido faz com que a cor do indicador mude de verde para amarelo, após incubação a 37°C entre 18 e 24 horas. Colônias não fermentadoras de sacarose são verdes (KAYSNER; HILL, 1994).

As técnicas de identificação do gênero podem ser feitas através de caracteres fenotípicos e/ou genotípicos. Porém, a primeira técnica, geralmente apresenta dificuldades na identificação devido a uma elevada diversidade bioquímica ocorrente nas espécies do gênero (ALSINA; BLANCH, 1994). Por isso, a taxonomia dos víbrios se encontra em constante processo de revisão devido à descoberta de novos dados obtidos por modernas técnicas de identificação biomolecular (GOMEZ-GIL et al., 2004). Atualmente o gênero compreende 83 espécies (DSMZ, 2008).

Os membros pertencentes à família *Vibrionaceae* possuem grande diversidade bacteriana. Algumas espécies são de vida livre e outras são simbióticas. Possuem grande importância ecológica em todo o globo devido ao fato de serem encontradas em vários nichos (NISHIGUCHI; NAIR, 2003).

Diversos estudos demonstram que os víbrios desempenham um papel fundamental na biodegradação, regeneração e nos ciclos biogeoquímicos de diversos nutrientes (DUCKLOW, 1983; JORGENSEN, 1983; COLWELL, 1994).

Porém, várias espécies de *Vibrio* são consideradas como patogênicas tanto para seres humanos quanto para organismos invertebrados como moluscos, crustáceos, dentre outros.

2.2.1 – Vibrioses em camarão

O surgimento de doenças vem-se tornando cada vez mais responsável por grandes perdas em cultivos de organismos aquáticos em todo o mundo, principalmente, o de camarões. As enfermidades afetam não só o setor econômico, mas também o social (LIN, 1995).

O processo de criação intensiva expõe os organismos a condições de estresses consideráveis de natureza química, física e/ou biológica. As altas densidades de estocagem, o fornecimento de grandes quantidades de alimento e o elevado volume de dejetos gerado pelos próprios organismos elevam os níveis de matéria orgânica e bactérias, desestabilizando assim o ambiente de cultivo (VANDSTEIN; REINERTSEN, 1993).

A saúde do camarão e, conseqüentemente, a produtividade de uma fazenda são fortemente influenciadas pelos fatores ambientais que prevalecem durante o cultivo. Portanto, a água possui vital importância nos sistemas de criação de camarão. A sua qualidade é responsável pela sobrevivência, crescimento, reprodução e produtividade (BOYD, 1979).

Portanto, desequilíbrios ambientais podem ocasionar variações na temperatura da água, pH, salinidade e na concentração de oxigênio. Essas condições adversas favorecem o crescimento de microrganismos, tendo como, por exemplo, os víbrios. Vários são os estudos que associam os víbrios às grandes perdas na carcinicultura (LAVILLA-PITOGO et al., 1998; VIEIRA et al., 2000). Holmström et al. (2003) concluíram na sua pesquisa que 86% das fazendas de camarão analisadas tinham problemas com vibrioses.

As vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, atacando todos os estágios de vida do camarão (HAMEED, 1993). Porém algumas espécies de víbrios também podem ser isoladas de camarões peneídeos saudáveis o que ressalta ainda mais o fato de serem consideradas como bactérias oportunistas. Esta hipótese vem sendo aceita mundialmente (RUANGPAN; KITAO, 1991; LIGHTNER, 1993; VANDENBERGHE et al., 1998). E isso ocorre porque, em condições adversas, os

microrganismos, ditos oportunistas, tendem a se manifestar de forma patogênica (HENNIG; ANDREATTA, 1998).

O processo de infecção da vibriose pode ser cuticular, entérico e/ou sistêmico (NUNES; MARTINS, 2002). Os camarões infectados internamente por víbrios apresentam sinais característicos quando estão próximos à morte; tais sinais incluem: fraqueza (os camarões se deitam no fundo do viveiro); nado desorientado; opacidade da musculatura abdominal; aumento da pigmentação; grampo na cauda e lesões escuras ou amarronzadas na cutícula (AUSTIN; AUSTIN, 1987).

Além desses sinais clínicos, os camarões infectados por alguma espécie patogênica de *Vibrio* podem apresentar intestino semivazio, anorexia, inflamação de alguns órgãos internos (órgão linfóide, coração, hepatopâncreas, etc). Pode-se também observar, através de microscopia, um grande número de bactérias presentes em suas hemolinfas durante uma septicemia. As vibrioses possuem várias denominações em todo o mundo, e algumas delas são: enfermidade bacteriana, enterite séptica hemocítica, síndrome das bolitas, septicemia bacteriana dos peneídeos, vibrioses dos peneídeos, vibriose luminescente, enfermidade das patas rochas, etc (AGUIRREZ-GÚZMAN, 2004).

A enfermidade, também conhecida como “Síndrome da gaivota”, foi causa de grandes perdas para a indústria de camarão no México, talvez por desconhecimento das técnicas de diagnóstico, assim como do tratamento adequado ao problema. As espécies mais comuns associadas a essas enfermidades são *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*. Apresentam-se ocasionalmente *V. damsela*, *V. fluvialis* e *V. splendidus* (PEREIRA; SANTOS, 2003).

2.3 – Principais víbrios patógenos

2.3.1 – *Vibrio alginolyticus*

V. alginolyticus é uma espécie que possui larga distribuição geográfica e pode ser encontrada em ambientes marinhos e estuarinos, especialmente em baías (LARSEN et al., 1981; BARBIERI et al., 1999). Alguns autores consideram *V. alginolyticus* como um potente patógeno em humano (LARSEN et al., 1981; MATSIOTA; NAUCIEL, 1993). Em adição, esta bactéria também está associada a diversos surtos de doenças em organismos marinhos (BALEBONA et al., 1998).

Em contradição, Gullian; Rodrigues (2002) afirmam que certas cepas de *V. alginolyticus* podem ser utilizadas como imunoestimulantes em larvas de *L. vannamei*. E podem até competir potencialmente com cepas patogênicas de *V. harveyi*. No estudo desses autores, *V. alginolyticus* chegou a inibir consideravelmente o crescimento de *V. harveyi* nos hepatopâncreas em camarões (GULLIAN; RODRÍGUEZ, 2002).

2.3.2 – *Vibrio harveyi*

V. harveyi é uma bactéria de vida livre e pode ser encontrada em diversos ambientes marinhos (RUBY et al., 1980). Quando cultivada em condições de laboratório, pode não apresentar caracteres virulentos. Alguns estudos sugerem o uso dessa bactéria como bioindicadora de populações mutagênicas em ambientes marinhos (CZYZ et al., 2000).

Várias são as espécies de víbrios que estão relacionadas com doenças em camarões. Dentre elas *V. harveyi* possui considerável importância devido a sua patogenicidade, que pode ser explicada pela presença de bacteriófagos (OAKLEY et al., 2002). Sua ocorrência é maior nos cultivos de *Litopenaeus. vannamei* e *Penaeus monodon* (AUSTIN et al., 2003).

Nos cultivos de camarões peneídeos, *V. harveyi* aparece com maior incidência no estágio de pós-larva, podendo ser encontrado nas outras fases, porém, com menor frequência. Pode ser também detectado em camarões selvagens (OWENS et al., 1992).

Algumas espécies de *Vibrio* podem apresentar o fenômeno da luminescência, uma delas é o *V. harveyi*. Lavilla-Pitogo; Pena (1998) relataram grandes mortalidades, cerca de 60%, em fazendas de camarão nas Filipinas, entre os anos de 1992 e 1994. Os autores sugerem que os produtores, quando detectarem visualmente a presença de luminosidade na coluna d'água e no corpo do camarão, associem o fato com uma possível enfermidade.

2.3.3– *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus pode ser encontrado em ambientes estuarinos e marinhos em todo o mundo. Algumas cepas de *V. parahaemolyticus* possuem o gene da

Thermostable Direct Hemolysin (tdh). Outras possuem o gene da *Thermostable Related Hemolysin (trh)* e há as que possuem ambos. Embora os mecanismos de atuação destes genes ainda não tenham sido bem esclarecidos, eles são correlacionados com o fator de virulência da espécie (HARA-KUDO et al., 2003).

A bactéria é considerada como um importante patógeno em humanos, nos casos de gastroenterites, que ocorrem, geralmente, após o consumo de pescados crus ou mal cozidos (LIMA, 1997). Pode também ser associada com outras infecções como septicemia, otites, feridas na pele e tecidos moles. Essas infecções são, geralmente, adquiridas por consumo de alimento e água contaminada ou mais raramente, por contaminação direta de feridas cutâneas ocorrida durante o contato com a água do mar ou de estuários (RODRIGUES et al., 2001).

V. parahaemolyticus também é mencionado como patógeno em camarões nas fases larval, juvenil e adulta (CHANRATCHAKOOL et al., 1995), sendo ainda mais patogênico no estágio larval (LIGHTNER, 1993).

2.3.4 – *Vibrio vulnificus*

V. vulnificus foi primeiramente descrito em 1976 pelo *Center for Disease Control* (HOLLIS et al., 1976). Requer sal para o seu crescimento e é considerado também como importante patógeno ao ser humano devido à produção de uma poderosa toxina extracelular. É classificado como sendo uma bactéria enteroinvasora (KREGGER; LOCKWOOD, 1981).

V. Vulnificus do biotipo I causa infecções em humanos e está associado com casos de doenças, seguidas de morte, já os biotipos II e III são detectados apenas em casos de doenças (BISHARAT et al., 1999). Pode ser encontrado em ambientes marinhos e estuarinos e nas superfícies externas e internas de várias espécies de organismos vertebrados e invertebrados, onde muitos dos quais são considerados alimentos comercialmente importantes em várias partes do mundo (OLIVER, 1989).

V. vulnificus está também associado a doenças em fazenda de camarão. Em 1995 houve vários surtos que envolviam a espécie em fazendas na Tailândia, nos cultivos de *Litopenaeus monodon* (AGUIRREZ-GÚZMAN, 2004).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Locais de coleta

As coletas da presente pesquisa foram realizadas em três fazendas do Estado do Ceará, nas cidades de Granja, Acaraú e Aracati (Figura 1), entre o período de outubro de 2005 (estação de estio) e outubro de 2006 (estação chuvosa).

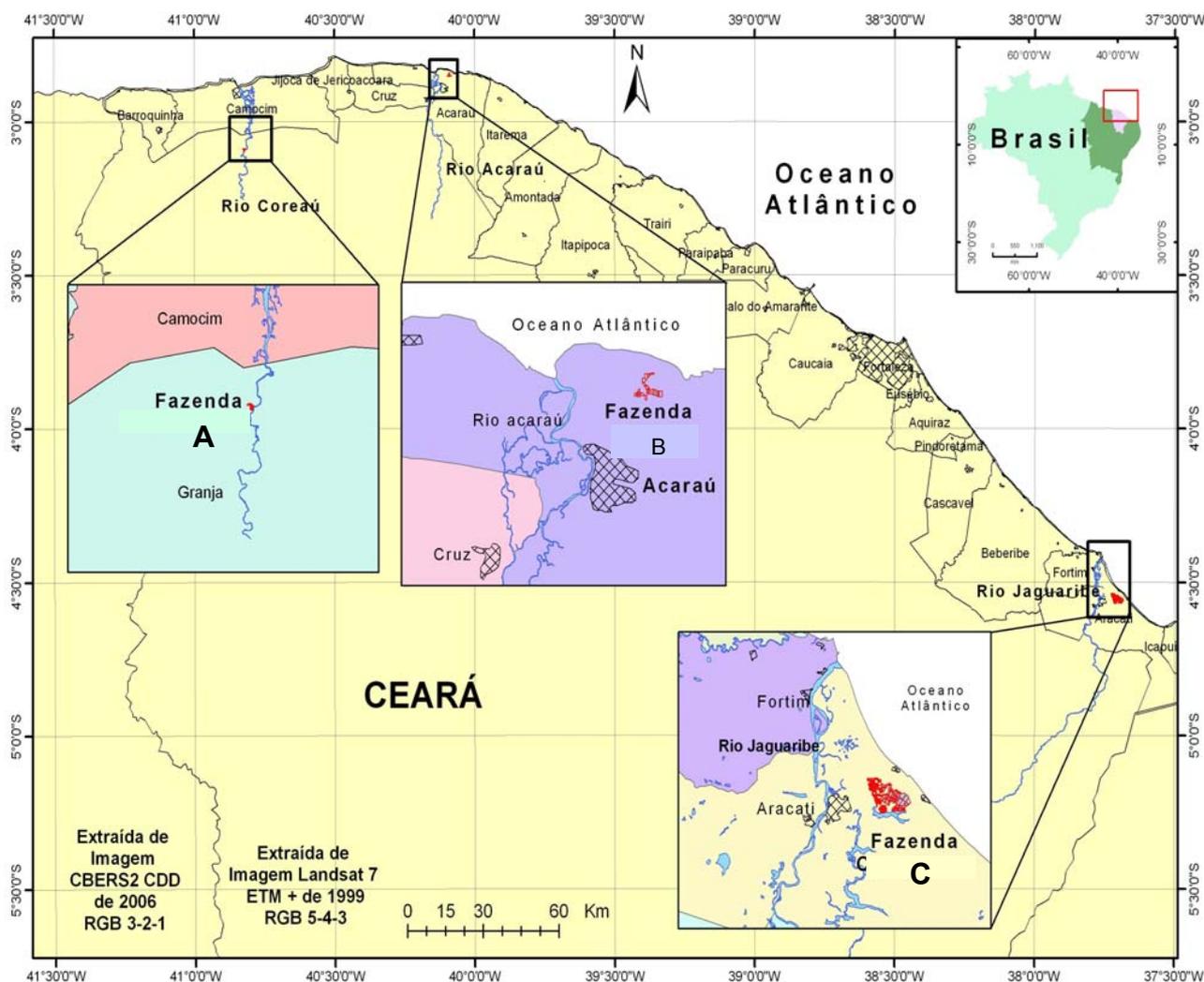


FIGURA 01: Mapa de localização das fazendas A, B e C (CE) de onde foram coletadas amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* nos períodos de estio e chuvoso.

Foram realizadas 18 coletas, oito no período de seco (outubro a janeiro) e dez no chuvoso (junho a outubro). Dessas 18 coletas, cinco foram realizadas na fazenda A, localizada no município de Granja, seis na fazenda B, em Acaraú e sete na fazenda C,

em Aracati. Em cada coleta, foram analisados 10 exemplares de camarão com tempo de cultivo que variou de 60 a 120 dias, totalizando 180 camarões amostrados.

As coletas foram realizadas com frequência mensal. Os camarões foram capturados com ajuda de uma rede e acondicionados em sacos plásticos com água do próprio cultivo para o transporte até o laboratório.

3.2 – Processamento das Amostras

3.2.1 - Teste de coagulação da hemolinfa

No laboratório, cada exemplar de camarão recebeu um código numérico (1, 2, 3, ..., até 10). Logo em seguida, suas carapaças eram desinfetadas com álcool a 70% antes das análises seguintes.

Uma seringa era então introduzida na parte dorsal do camarão, abaixo do cefalotórax, para perfurar o músculo do camarão. Logo após, cada exemplar era inclinado sobre uma lâmina a fim de se colher o material que constava de aproximadamente duas gotas de hemolinfa. Um esfregaço desse material era feito sobre a lâmina com o auxílio da própria seringa e simultaneamente, se observava o tempo de coagulação (Figura 2). De acordo com Pereira; Santos (2003) se o tempo de coagulação estivesse abaixo de 40 segundos, o camarão era considerado sadio; caso contrário, o camarão, provavelmente, estava predisposto a doenças.

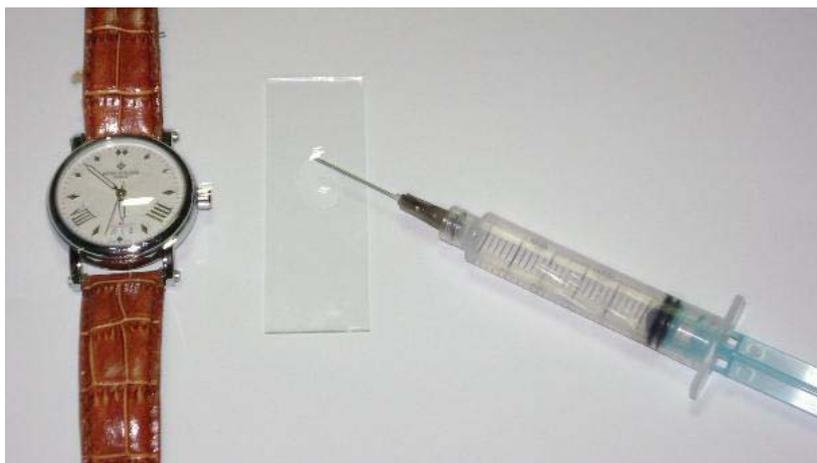


FIGURA 2: Teste de coagulação da hemolinfa

3.2.2 – Extração da hemolinfa

Independente do resultado do teste do tempo de coagulação dos camarões, sempre se procedeu à quantificação de vibrios.

A extração da hemolinfa foi feita de acordo com a técnica descrita por *op cit.* (2003). A retirada da hemolinfa era feita na região abdominal do camarão (já desinfetada previamente com álcool 70%). Em seguida, uma seringa de insulina hipodérmica estéril era introduzida na região ventral, entre o final do cefalotórax e o primeiro segmento abdominal (Figura 3). A seringa continha uma solução de citrato de sódio a 10% para evitar a coagulação do material extraído no exato momento da retirada. A proporção usada dessa solução e a do líquido extraído (hemolinfa) foi de 1:1.



FIGURA 3: Extração da hemolinfa.

3.3 – Contagem e Isolamento de *Vibrio* spp.

3.3.1 – Semeadura Inicial das amostras

Da primeira diluição (2x) da solução de hemolinfa 1:1 (citrato de sódio e hemolinfa), foram retirados 0,2 mL e adicionados em 1,8 mL de Água Peptonada a 1% de cloreto de sódio. Das duas diluições (2x e 10⁻²) foram retiradas alíquotas de 0,2 mL e as mesmas, em seguida, foram espalhadas, com o auxílio de bastão de vidro em “L” (alça de Drigalski) esterilizado, na superfície de placas, em duplicata, contendo o meio Agar Tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS). As placas foram então incubadas

invertidas em estufa, onde permaneceram por 18 horas a 37°C (ELLIOT et al., 2001), de acordo com a figura 4.

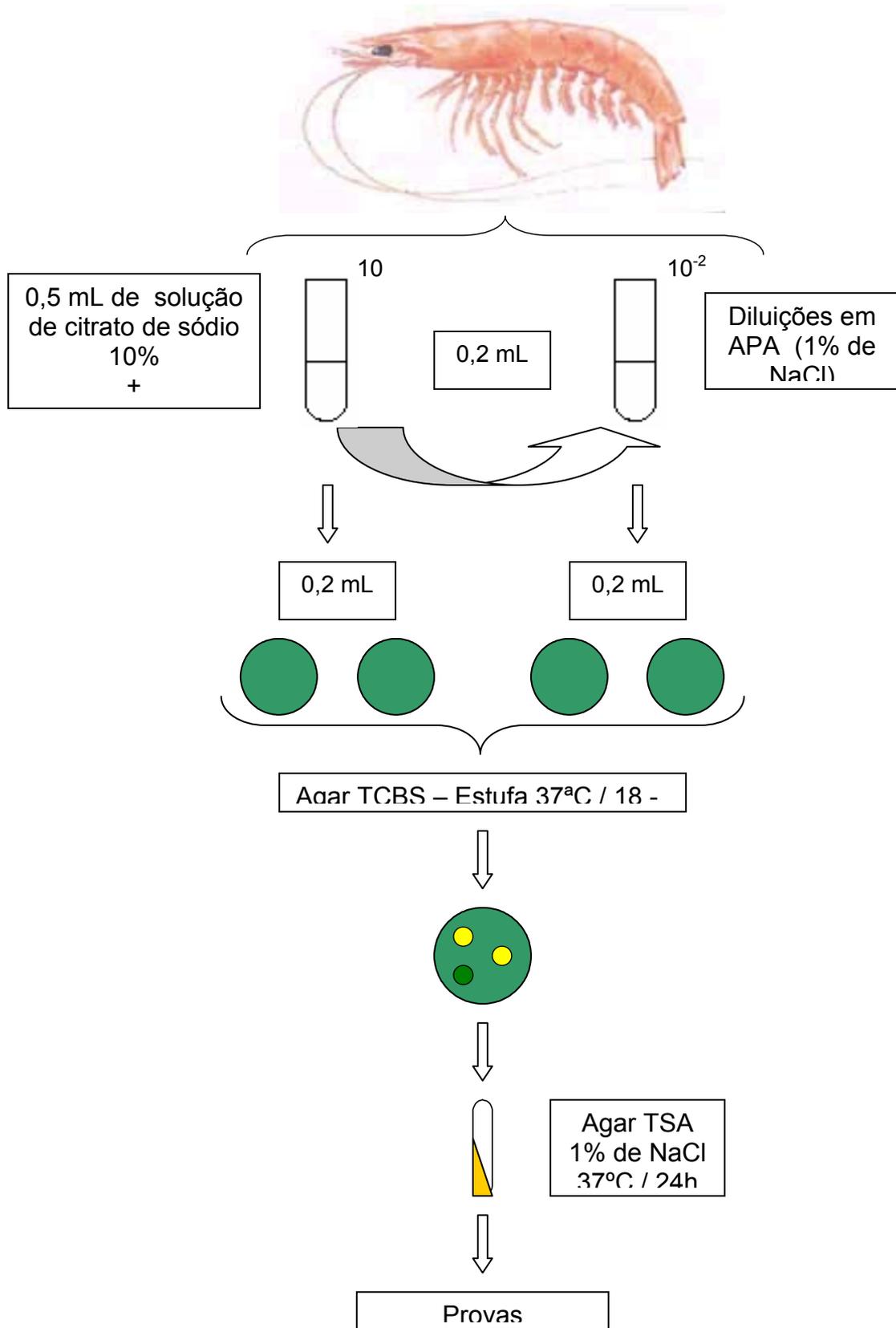


FIGURA 4: Fluxograma da análise bacteriológica da hemolinfa.

3.3.2 – Contagem e Isolamento de Colônias Suspeitas

A contagem das colônias foi realizada com um contador de colônias marca PHOENIX mod. EC 550AS. Se a escolha da placa recaiu na diluição de 2x, isto é, se nessa diluição cresceram entre 25 e 250 colônias, então o cálculo era feito da seguinte forma:

NÚMERO DE COLÔNIAS X FATOR DE DILUIÇÃO X ALÍQUOTA USADA NA PLACA (0,2 mL).

$$\text{NÚMERO DE COLÔNIAS} \times 2 \times 5 = \text{UFC} / \text{mL}$$

Quando não havia crescimento no intervalo 25 – 250 colônias, o resultado era então expresso como UFC / mL / estimada.

3.4 - Identificação Morfológica e Bioquímica das Espécies de *Vibrio spp*

As colônias com características sacarose negativa e positiva sobre o meio Ágar TCBS, foram isoladas em Ágar Triptona Soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 horas. As colônias puras isoladas foram submetidas à coloração de Gram e aos testes de motilidade, oxidase, produção de indol, Voges-Proskauer, tolerância ao NaCl 0%, 3%, 6%, 8% e 10% em água peptonada a 1%, fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, glicose, arabinose e manose), descarboxilação de aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), produção de gás a partir de glicose e ONPG, conforme detalhamento em Elliot et al. (2001) sendo complementados por testes indicados nas chaves de identificação descrita em Alsina; Blanch, (1994).

3.4.1 - Coloração de Gram

Do crescimento no meio de TSA com 1% de NaCl foi feito esfregaço em lâminas, seguindo-se sua fixação por calor e coloração de Gram de acordo com Soares et al. (1991). A coloração consistiu nas seguintes etapas: adição de cristal violeta por 1 minuto; adição de lugol por 1 minuto; lavagem com álcool etílico; lavagem com água destilada corrente; adição de safranina por 30 segundos; lavagem com água destilada corrente; e secagem. As lâminas adicionadas de uma gota de óleo mineral foram examinadas em microscópio ótico.

3.4.2 - Motilidade

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retirados inóculos e semeados com agulha de níquel-cromo no ágar Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM), com incubação a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos tubos, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram crescimento com migração da linha da picada (linha de inoculação) e difusão para todo o meio, causando sua turvação.

3.4.3 - Identificação bioquímica de cepas de *Vibrio* spp

A metodologia seguida para realização das provas bioquímicas está de acordo com Downes; Ito, 2001; Vieira et al., 2004; Kaysner; Depaola, 2004 e Alsina; Blanch, 1994.

3.4.3.1 - Prova de Produção de Citocromo-Oxidase

Do crescimento das cepas em TSA inclinado contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com emprego de palitos de madeira esterilizados. Foram feitos esfregaços em discos de papel previamente embebidos com solução aquosa de cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina a 1% (recém-preparada). O teste foi considerado positivo quando uma coloração azul arroxeado surgia em 10 segundos. Essa prova é considerada positiva para quase todos os membros da família Vibrionaceae, com exceção do *V. metschnikovii* e *V. gazogenes*.

3.4.3.2 - Produção de Indol

Do crescimento das cepas no meio de TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com agulha de níquel-cromo e semeada em agar SIM com 1% de NaCl. Incubação em estufa a 35°C por 48 horas. Transcorrido o período de incubação, foi adicionado à cultura 1mL de reativo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído).

A prova foi considerada positiva quando do aparecimento de um anel vermelho no meio de cultura, indicando a produção de indol a partir da degradação do aminoácido triptofano pela enzima bacteriana triptofanase (COSTA, 1979).

3.4.3.3 - Prova do Voges-Proskauer

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retiradas alíquotas com alça de níquel-cromo e semeadas em Caldo MRVP, com incubação a 35°C por 96 horas. Após o período de incubação, foram adicionados para cada mililitro de cultura 0,6mL de Barrit 1 (solução de alfa-naftol a 5%) e 0,2mL de Barrit 2 (hidróxido de potássio a 40%).

A prova foi considerada positiva quando do aparecimento de anel vermelho no meio de cultura, indicando a presença do acetil-metil-carbinol (acetoína), que na presença do hidróxido de potássio e do oxigênio atmosférico é convertida em diacetila, sendo convertida em complexo vermelho sob a ação catalítica do alfa-naftol.

3.4.3.4 -Tolerância ao NaCl

A partir do crescimento em Água Peptonada Alcalina (APA) contendo 1% de NaCl, foram retiradas alíquotas com alça de níquel-cromo e semeadas em tubos contendo APA a 1% com 5 concentrações diferentes de NaCl. A primeira bateria foi a 0% de NaCl, a segunda a 3% de NaCl, a terceira a 6% NaCl, a quarta a 8% NaCl e a quinta a 10% de NaCl. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas.

Foi realizada observação após o período de incubação, e os resultados foram considerados positivos quando houve turvação no meio de cultura.

3.4.3.5 - Fermentação de Carboidratos

As cepas em identificação no TSA contendo 1% de NaCl foram inoculadas com alça de níquel-cromo nos tubos contendo caldo púrpura de bromocresol (meio basal) e os carboidratos a serem testados, com incubação a 35°C por 5 dias. Foram preparadas cinco baterias de tubos. A primeira com 0,5% de lactose, a segunda com 0,5% de sacarose, a terceira com 0,5% de manose, a quarta com 0,5% de arabinose e a quinta com 0,5% de glicose. Aos tubos contendo o meio basal e 0,5% de glicose foram acrescentados tubos de Duhran invertidos, a fim de se determinar a produção de gás.

Foram realizadas observações diárias para verificação da mudança de coloração do meio da cor púrpura para amarelo, o que indica prova positiva.

3.4.3.6 - Hidrólise da Arginina e Descarboxilação de Lisina e Ornitina

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, foi feita a inoculação de cada cepa em três tubos contendo o meio basal com 1% de NaCl, sendo adicionado, separadamente, arginina, lisina e ornitina. Paralelamente, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer aminoácido (controle). Após a inoculação em cada tubo foi adicionado um cm de óleo mineral esterilizado procedendo-se a seguir a incubação dos tubos a 35°C por até 4 dias. O meio inoculado torna-se amarelo como resultado da produção de ácido oriundo da glicose existente no meio basal. Quando a reação positiva ocorre, o meio torna-se alcalino, de cor púrpura e, o tubo controle permanece ácido, de cor amarela.

3.4.3.7 - Prova do ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo)

Do crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com agulha de níquel-cromo e semeada em tubos contendo 0,25mL de solução salina fisiológica estéril. Foi adicionada uma gota de tolueno em cada tubo com posterior agitação. Os tubos ficaram em repouso por cinco minutos à temperatura de 35 a 37°C. Em seguida, foi adicionada uma solução tamponada de ONPG 13,3 mM na quantidade de 0,25mL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C.

Foram realizadas observações após 30 minutos, 1 hora e 24 horas de incubação. A positividade da prova foi dada pela mudança de coloração do meio, de incolor para amarelo, indicando a hidrólise do ONPG pela enzima β -D-galactosidase.

Os testes adicionais empregados na chave de identificação foram:

- ♦ Teste da Liquefação da Gelatinase

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retirados inóculos e semeados com uma alça de níquel-cromo no meio Ágar Gelatina, acrescido de 1% de NaCl, com incubação a 35°C/1-5 dias. Após o período de incubação foi realizada a

leitura dos tubos, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram crescimento causando turvação e liquefação do meio.

- ♦ Resistência ao O/129 10 μ g

As cepas identificadas e isoladas em TSA contendo 1% de NaCl foram inoculadas em tubos contendo solução salina a 0,85% de modo que a solução final fosse comparativamente semelhante à solução de McFarland 0,5. Os tubos ajustados tiveram uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células por mililitro. Das soluções ajustadas, foram retirados inóculos com emprego de *swab* e semeados em placas contendo meio de Muller-Hinton com 1% de NaCl. Em seguida coloca-se o disco do agente vibriostático O129/10 μ g e incuba-se a 35°C/ 24h. A positividade do teste se dá através da presença de uma zona de inibição ao redor do disco.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

O intervalo do tempo de coagulação da hemolinfa dos indivíduos de cada fazenda, tanto no período seco quanto no chuvoso, respectivamente, apresentou as seguintes variações: para a fazenda A, 18 a 28' e de oito a 31'; para a Fazenda B, de sete a 25 ' e de cinco a 55' e finalmente de 16 a 20' e de oito a 41 segundos para a fazenda C.

O tempo de coagulação da hemolinfa é comumente utilizado pelos carcinicultores brasileiros para avaliar o estado de saúde dos camarões, porém, não existe um valor referencial que possa ser adotado com segurança para essa avaliação (FRELIER et al., 2004).

Alday-Saenz (1994) cita que a hemolinfa de camarões infectados por bactérias tende a coagular lentamente, cerca de mais de um minuto, em temperaturas que variam de 20 a 30°C, enquanto a hemolinfa de um animal sadio tende a coagular em menos de um minuto.

Na literatura há discordância entre os autores com relação a adoção de um valor para o tempo de coagulação da hemolinfa. Alguns citam como aceitável apenas 20 segundos. Porém há outros que relatam que o tempo de coagulação da hemolinfa em camarões de cultivo é tido como aceitável quando for menor ou igual a 40 segundos (PEREIRA; SANTOS, 2003). Esse tempo de 40 segundos foi o adotado no presente estudo uma vez que é o período de tempo mais utilizado pelos carcinicultores do Nordeste.

Segundo Tait (1911), o fenômeno da coagulação da hemolinfa em crustáceos é considerado como um complexo processo bioquímico por envolver vários componentes, e cada espécie pode se apresentar de forma diferente. O mesmo autor ressalta que esse fato está sempre relacionado com a quantidade de hemócitos livres e, com casos de injúrias do animal, tanto por bactérias, vírus ou outros parasitas.

Os camarões apresentam um mecanismo de defesa simples e primitivo, e nesse mecanismo os hemócitos realizam uma importante função de defesa, incluindo coagulação, identificação de corpos estranhos, fagocitose, melanização, encapsulação, citotoxicidade e comunicação intracelular. Durante uma infecção o número de hemócitos pode baixar consideravelmente e quando se constata a sua instalação, novos hemócitos precisam ser produzidos pelo tecido hematopoiético, e isso prejudica, dentre outros fatores, a coagulação da hemolinfa (SANTOS et al., 2005).

A Contagem Padrão em Placas (CPP) de *Vibrio* das amostras de hemolinfa dos 180 camarões coletados nas três fazendas de cultivo, nos dois períodos (seco e chuvoso), variou de 10 a 28.000 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Nas três fazendas, 51 dos indivíduos examinados, 28,3%, exibiram vibrios em suas hemolinfas ao longo dos estágios de vida (60, 76, 90 e 120 dias) avaliados (Tabelas 1, 2 e 3).

Durantes os meses de janeiro e maio, em oito coletas realizadas, Gopal et al. (2005) relataram uma CPP de *Vibrio* de 1.520 a 47.300 UFC/mL em hemolinfa oriundas de camarões cultivados em fazendas nas costas leste e oeste da Índia, portanto, números maiores que os encontrados na presente pesquisa.

Tabela 1 - Estimativas na Contagem Padrão em Placas (CPP) de *Vibrio* por mililitro de hemolinfa obtidas das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivado na fazenda A, localizada no município de Granja-CE, no período de outubro/05 a outubro/06.

Período	Coleta	Dias de cultivo	Estimativa / indivíduo	
			Tempo de coagulação (s)	UFC / mL
Seco	1 ^a	90	28	1.000 (est.)
	2 ^a	120	21 18	1.000 (est.) 1.000(est.)
Chuvoso	3 ^a	120	20	110 (est.)
			8	30 (est.)
			19	140 (est.)
			30	20 (est.)
			24	60 (est.)
			8	30(est.)
			21	60 (est.)
13	20 (est.)			
			10	10 (est.)

Tabela 2 - Estimativas da Contagem Padrão em Placas (CPP) de *Vibrio* por mililitro de hemolinfa obtidas das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivado na fazenda B, localizada no município de Acaraú-CE, no período de outubro/05 a outubro/06.

Período	Coleta	Dias de cultivo	Estimativa por indivíduo	
			Tempo de coagulação (s)	UFC / mL
Seco	1 ^a	60	8	22.000 (est.)
			15	2.000 (est.)
	2 ^a	90	13	1.000 (est.)
			8	9.000 (est.)
			7	28.000(est.)
			12	9.000 (est.)
			25	5.000 (est.)
Chuvoso	1 ^a	60	10	1.000 (est.)
			15	480
			48	1.000 (est.)
			14	2.000 (est.)
			28	990
			14	360
			9	790
	3 ^a	120	17	300
			15	10 (est.)
			42	65 (est.)
			5	10 (est.)
			24	65
			53	10 (est.)
		55	110 (est.)	

Tabela 3 - Estimativas na Contagem Padrão em Placas (CPP) de *Vibrio* por mililitro de hemolinfa obtidas das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivado na fazenda C, localizada no município de Aracati-CE, no período de outubro/05 a setembro/06.

Período	Coleta	Dias de cultivo	Estimativa por indivíduo	
			Tempo de coagulação (s)	UFC / mL
Seco	1 ^a	60	16	1.000 (est.)
	2 ^a	90	20	110
Chuvoso	1 ^a	60	12	1.000 (est.)
	2 ^a	76	17	20 (est.)
	3 ^a	90	16	30 (est.)
			10	40 (est.)
			23	10 (est.)
			19	95 (est.)
			13	110 (est.)
			22	105 (est.)
			18	240 (est.)
			8	10 (est.)
	10	1.605		
	14	1.165		
	4 ^a	120	41	185 (est.)
			34	15 (est.)
18			70 (est.)	
19			20 (est.)	

Dezoito coletas realizadas nos dois períodos (seco e chuvoso), em cinco (27,2%) não houve nenhum crescimento de vibrios, mas em 72,8% pôde-se quantificar a bactéria. Em ambos os períodos, foi possível se quantificar *Vibrio*, em maior ou menor quantidade na hemolinfa do camarão cultivado.

No período seco, as CPPs de *Vibrio* na hemolinfa das amostras, coletadas nas três fazendas, variaram de 110 a 28.000 UFC/mL, sendo que apenas 12 (15%) exemplares, dos 80 estudados nessa estação climática, apresentaram a bactéria em

suas hemolinhas. Os intervalos da CPP de *Vibrio* na hemolinha dos camarões das fazendas A, B e C, na estação seca, foram respectivamente: 1.000; 1.000 a 28.000 e 110 a 1.000 UFC/mL (Tabelas 1, 2 e 3).

De acordo com Santos (2005) é considerada normal uma biomassa bacteriana menor que 300 UFC/mL em hemolinha. No entanto, na presente pesquisa, no período seco, todos os exemplares, dos que apresentaram *Vibrio* em suas hemolinhas, tiveram valores maiores que o preconizado pelo autor, com exceção de um exemplar, da segunda coleta da fazenda C, que mostrou uma CPP de *Vibrio* de apenas 110 UFC/mL na hemolinha.

Bactérias do gênero *Vibrio* podem alterar o tempo de coagulação da hemolinha em camarões que estejam com vibriose instalada. Essa bacteremia promove a ativação da cascata coagulativa tendo como resultado, o prolongamento no tempo de coagulação da hemolinha (FRELIER et al., 2004).

Durante o período de chuva, nas três fazendas, dos 100 examinados, 39 (39%) apresentaram infecção com essa bactéria. Portanto, um percentual maior do que aquele verificado durante o período seco que foi de 15%. A variação nas CPPs de *Vibrio* na hemolinha dos crustáceos, no período chuvoso, nas três fazendas, foi de 10 a 2.000 UFC/mL. Para as fazendas A, B e C os intervalos das CPPs de *Vibrio* foram de 10 a 140; 10 a 2.000 e 10 a 1.605 UFC/mL na hemolinha, respectivamente (Tabela 1, 2 e 3).

Na legislação do CONAMA (2005) há limites para o número de coliformes a 44,5° C nos corpos hídricos, porém a mesma não delimita a quantificação de víbrios em água de cultivo de organismos aquáticos. O presente trabalho somente pesquisou *Vibrio* na hemolinha do camarão, uma vez que este parâmetro pode servir para se saber quão contaminado o camarão está, e alertar aos carcinicultores de um possível surto de vibriose, caso houvesse descuido no manejo dos animais na fazenda.

Esta preocupação é compartilhada com Goarant et al. (1999) que também afirmam, que o número elevado de víbrios nos sistemas de cultivo representa risco à atividade quando da instalação de condições ambientais desfavoráveis, o que fatalmente provocaria situações de risco para a saúde dos camarões. Segundo os autores, os víbrios são responsáveis pelas principais patologias bacterianas nos cultivos de peneídeos, e chegam a provocar altos índices de mortalidade com perdas econômicas significativas nos países produtores.

Na fazenda A, nos dois períodos, dos 50 camarões examinados apenas 12 apresentaram víbrios em suas hemolinhas, sendo o percentual dessa presença, maior,

no período chuvoso (15%-seco e 30%-chuvoso). Esta foi a fazenda, dentre as três, que apresentou o menor percentual de camarões contaminados com víbrios. Apenas 12 indivíduos estavam contaminados nas duas estações: três no período seco e nove no período chuvoso. Em todas as fazendas, o período de chuva concorreu para a contaminação por víbrios.

Em uma fazenda, localizada no estuário do mesmo rio que alimenta a fazenda A, Costa (2006) encontrou uma alta carga de *Vibrio* em 24 amostras de músculo de camarão. O valor foi superior a 11×10^5 NMP/g em camarões isolados dos diferentes estágios de desenvolvimento e durante dois ciclos de cultivo.

Para a fazenda B, as CPPs de *Vibrio* nas amostras de hemolinfa de camarão oscilaram entre 10 e 28.000 UFC/mL. Dos 60 camarões analisados 21 apresentaram víbrios em suas hemolinfas. Nessa fazenda, no período seco, houve um maior crescimento no número de colônias de *Vibrio* nas amostras, e o número de indivíduos contaminados foi, visivelmente, maior (Tabela 2).

O rio Acaraú, onde se localiza a fazenda B, possui o maior número de fazendas de carcinicultura do Estado do Ceará, cerca de 32, e segundo Brito et al. (2004) é considerado muito poluído. Portanto, o aporte de matéria orgânica, sobretudo no inverno, onde mais coletas apresentaram indivíduos contaminados com víbrios, deve ser consideravelmente grande, favorecendo assim, o crescimento de microrganismos.

Na Fazenda C a CPP total de *Vibrio* na hemolinfa dos 18 exemplares de camarão que exibiram víbrio apresentou um intervalo de 10 a 1.605 UFC/mL, compreendendo os dois períodos (seco e chuvoso). Na estação seca somente dois indivíduos apresentaram víbrios em suas hemolinfas (Tabela 3). Esse dado é semelhante ao encontrado na Fazenda A, quando apenas três indivíduos estavam contaminados com *Vibrio* (Tabela 1). Já no período chuvoso, 16 indivíduos estavam contaminados com a bactéria.

Araújo et al. (2005) estudando o mesmo estuário onde se localiza a Fazenda C, afirmam que o baixo Jaguaribe também é considerado poluído porque além de sofrer impactos da urbanização, também sofre impactos das fazendas de carcinicultura situadas ao longo do rio. Segundo esses autores, isso ocorre devido ao fato de que as mesmas não tratam adequadamente os seus efluentes no momento das despescas dos viveiros. Portanto, como já foi dito anteriormente, a poluição e a contaminação dos corpos hídricos, devido a uma maior oferta de matéria orgânica, tende a favorecer o aparecimento de microrganismos.

Lima (2007) pesquisando amostras de água e hepatopâncreas, nos mesmos períodos e nas mesmas fazendas, obteve resultados semelhantes aos da presente pesquisa. É importante frisar que dentre todas as fazendas e nos dois períodos, a fazenda B foi a que apresentou maiores contagens de víbrios nas hemolinhas dos camarões, sendo que no período chuvoso o percentual de animais contaminados, nas três fazendas, foi muito maior.

O tempo de coagulação da hemolinfa dos 12 camarões que apresentaram *Vibrio*, nas três fazendas, no período seco, variou de sete a 28 segundos. No período chuvoso, essa variação foi de cinco a 55 segundos, quando o número de camarões infectados por *Vibrio* foi de 39 exemplares, representando mais que três vezes o número de camarões contaminados no período sem chuva. Entretanto, essa comparação, tempo de coagulação da hemolinfa x contaminação por *Vibrio*, não mostra que haja uma correlação direta entre esses fatores, uma vez que nem sempre o indivíduo que apresentou um tempo alto para coagulação da hemolinfa necessariamente apresentou altas contagens para *Vibrio* (Tabelas 1, 2 e 3).

Houve indivíduos, tanto no período seco como no chuvoso, que não exibiram víbrios em suas hemolinhas. Em algumas amostras, por vezes em 100% das coletas, não se constatou crescimento nas placas de ágar TCBS. Este fato pode ser observado nas primeira e segunda coletas do período chuvoso, na fazenda A; na terceira do período seco e na segunda do período chuvoso na fazenda B e na terceira do período seco, na fazenda C .

Diversos estudos em crustáceos demonstram a habilidade de algum fator da hemolinfa influenciar na inibição do crescimento bacteriano (CHISHOLM; SMITH, 1992; NOGA et al., 1996). Sung et al. (1996) constataram que células de *V. vulnificus* foram eliminadas da hemolinfa de *P. monodon*, após 12 horas da sua inoculação, desaparecendo completamente em 24 horas. Adams (1991) relataram que mais de 99% de cepas de *V. alginolyticus* foram eliminadas da hemolinfa de *P. monodon*, após quatro horas da inoculação dessa bactéria.

Importantes avanços estão sendo dados para se obter um conhecimento mais aprofundado da imunologia em crustáceos (BACHÈRE et al., 2004). A inibição de bactérias em suas hemolinhas pode ser explicada pela presença de peptídeos antimicrobianos, denominados de peneidinas, descobertas na hemolinfa de *Penaeus vannamei* por Destoumieux et al. (1997). Segundo Destoumieux et al. (2000), as

peneidinas contribuem para a eliminação de microrganismos, através da fagocitose, atuando como antibióticos endógenos.

Fatores tais como, salinidade, temperatura e pH afetam diretamente a distribuição de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, no meio ambiente (MOTES et al., 1998; JIANG; FU, 2001).

A temperatura e o pH, na água dos viveiros amostrados, variaram de 25 a 30°C, e de 7,5 e 8,5, respectivamente. A flutuação nos valores de salinidade foi de 0 a 53‰ (dados cedidos pelas fazendas). O único fator que poderia afetar no crescimento dos víbrios, nesse caso, seria a salinidade. Segundo Thompsom et al. (2004), oscilações na salinidade podem influenciar no isolamento de microrganismos. Os víbrios apresentam necessidade de sais para o seu crescimento, e quando suas células são submetidas a estresse, pode ocorrer dificuldade em seu cultivo sobre o meio TCBS, devido ao fato de ficarem no estado de “viável mas não cultivável” (VNC).

Nos 51 camarões que portavam *Vibrio*, o tempo total de coagulação da hemolinfa dos indivíduos analisados nas três fazendas, tanto no período seco, como no chuvoso, variou de cinco a 55 segundos (Figura 5, 6 e 7).

Nas três fazendas e nos dois ciclos, desses 51 indivíduos, apenas 10% tiveram o tempo de coagulação da hemolinfa acima de 40 segundos, ou seja, a maioria apresentou um tempo inferior a 40 segundos. De acordo com Pereira; Santos (2003) a maior parte dos exemplares poderia ser considerada aparentemente sadia, já que esses mesmos autores só aconselham a realização da análise microbiológica da hemolinfa, quando a mesma exceder 40 segundos para coagular ou quando estiver turva ou avermelhada. Porém, como visto nas figuras 5, 6 e 7, alguns exemplares com tempo de coagulação considerado baixo, tiveram uma CPP alta, como é o caso do exemplar de número quatro, oriundo da fazenda B, que no período seco expressou a maior CPP da pesquisa e em apenas sete segundos sua hemolinfa coagulou (Tabela 2).

Gómez-Gil et al. (1998) obtiveram em amostras de hemolinfa de pós-larvas do camarão *P. vannamei* uma CPP de *Vibrio* que variou de 1.600 a 3.000 UFC/mL da hemolinfa. Os autores verificaram a presença de espécies de víbrios patogênicas em camarões que tiveram seu tempo de coagulação considerado baixo, menor que um minuto.

Através dessa e de outras pesquisas, pode-se avaliar a inexistência de um consenso sobre um intervalo de tempo padrão para coagulação de hemolinfa, através do qual se pudesse demarcar um intervalo de normalidade na saúde dos camarões.

Smith; Johnston (1992) afirmam que bacteremias podem alterar esse parâmetro, porém o mesmo, quando adotado, isoladamente, é insuficiente para se concluir sobre a sanidade dos organismos aquáticos. Quando utilizado, deve ser associado a outros fatores tais como físicos, químicos e biológicos. Isto pode ser comprovado pela pesquisa de Gondko et al. (1981) que estudando a coagulação da hemolinfa em *crayfish*, concluíram que a mesma expressou valores diferentes para machos e fêmeas, outro fator que deveria ser considerado.

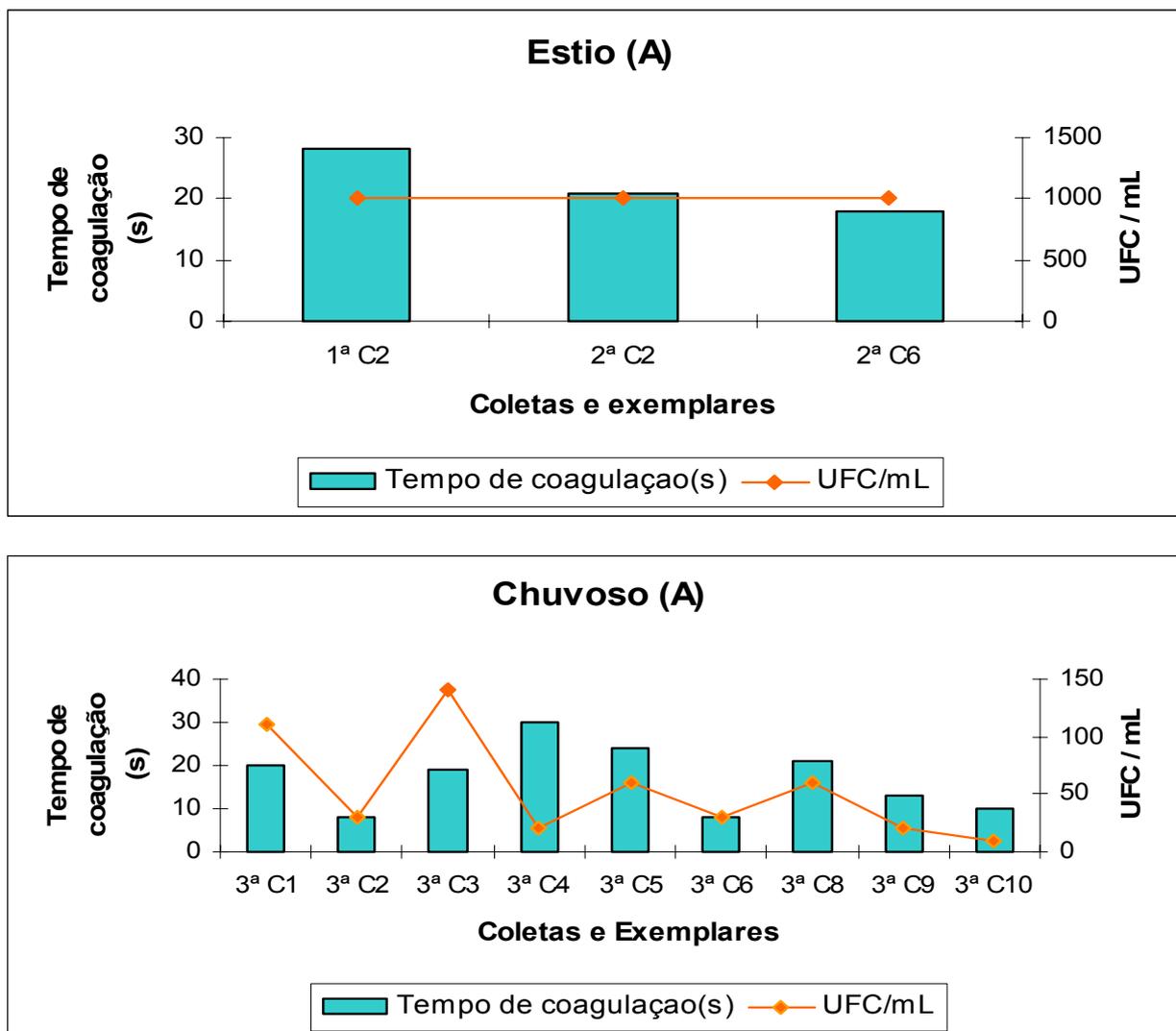


FIGURA 5: Gráficos referentes à Contagem Padrão em Placas (CPP) de vibrios por mililitro de hemolinfa obtida das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivados na fazenda A, no período de outubro/05 a agosto/06, com tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias.

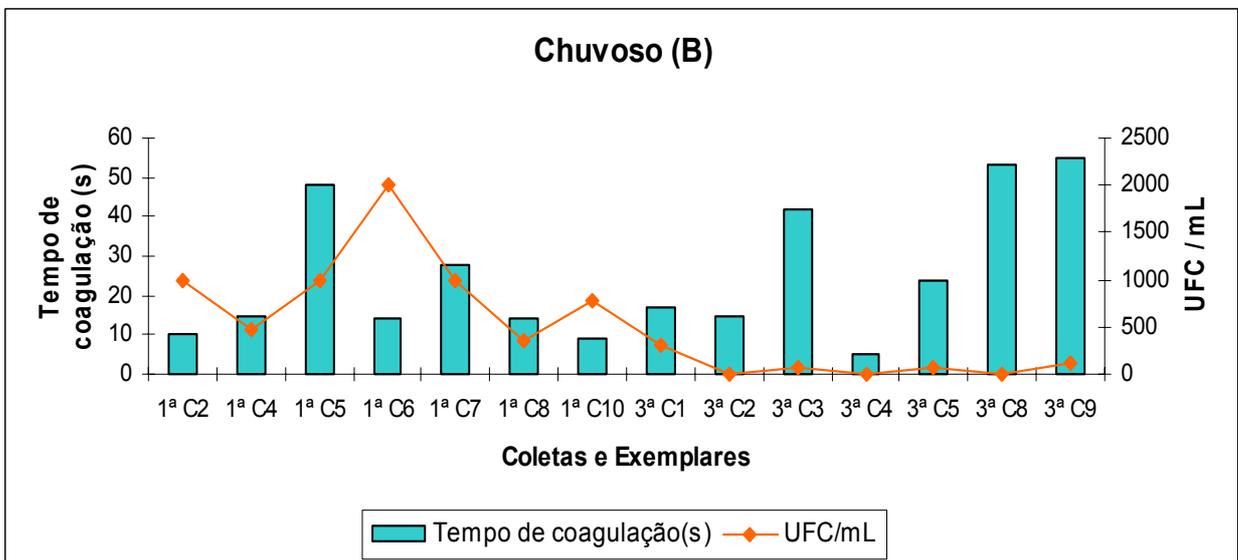
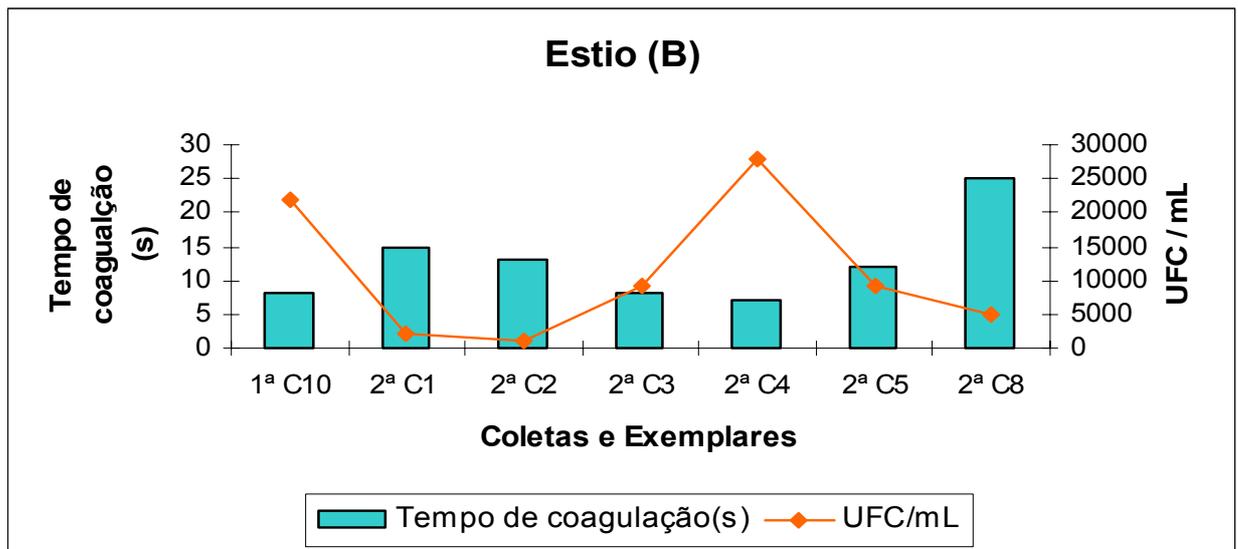


FIGURA 6: Gráficos referentes à Contagem Padrão em Placas (CPP) de vibrios por mililitro de hemolinfa obtida das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivados na fazenda B, no período de outubro/05 a agosto/06, com tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias.

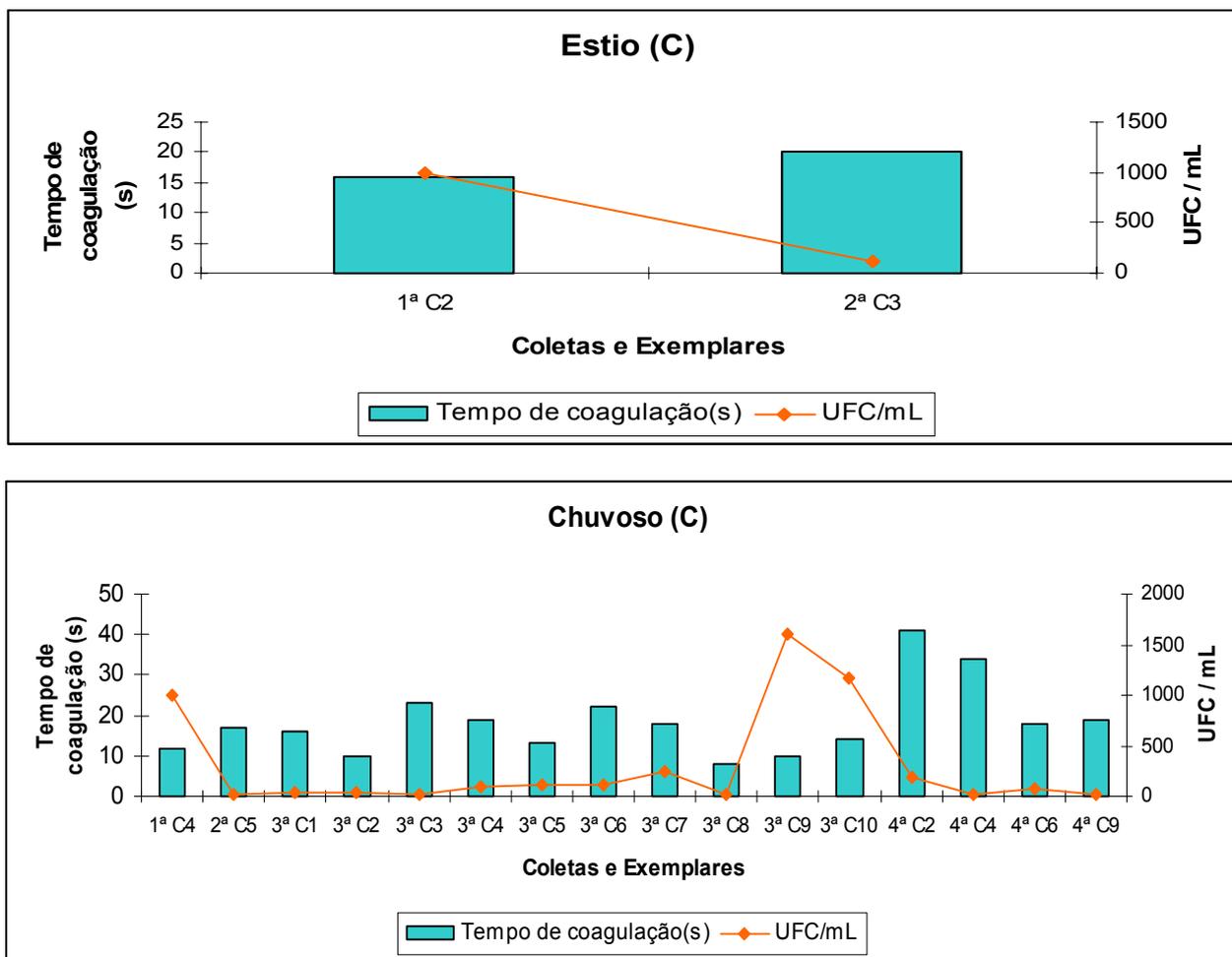


FIGURA 7: Gráficos referentes à Contagem Padrão em Placas (CPP) de vibrios por mililitro de hemolinfa obtida das amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivados na fazenda C, no período de outubro/05 a agosto/06, com tempo de cultivo variando de 60 a 120 dias.

O intervalo de tempo de coagulação da hemolinfa dos 129 exemplares que não exibiram *Vibrio* nas três fazendas e nos dois períodos foi de quatro a 57 segundos. Curioso é que, embora não exibindo crescimento de *Vibrio* em suas hemolinfas, dois desses animais apresentaram um intervalo de tempo maior na coagulação desse material, do que o dos camarões onde se pôde quantificar esse gênero bacteriano,

sugerindo que o crescimento de *Vibrio* não influencia no tempo de coagulação da hemolinfa.

Enfatizando a premissa de que a hemolinfa deve ser se não estéril, pelo menos pouco contaminada (LIGHTNER, 1977), não era o esperado encontrar víbrios nas amostras de hemolinfas que tiveram seu tempo de coagulação baixo. Isso não foi verdadeiro, uma vez que foi encontrado *Vibrio* em hemolinfas de camarões que coagularam em apenas sete segundos (Tabela 2).

Durante o período da presente pesquisa, não foram relatadas mortalidades significantes nessas fazendas. No entanto, segundo dados do Centro de Diagnósticos de Enfermidades de Camarão Marinho (CEDECAM) – LABOMAR - UFC, após análises histopatológicas dos camarões oriundos das mesmas coletas, foram constatadas patogenias de importância para a carcinicultura. As amostras de camarão, das fazendas A, B e C, apresentaram indícios de gregarina e necrose no epitélio subcuticular, a partir do 30º dia de cultivo. No decorrer do ciclo de cultivo, foram diagnosticados IMNV (Vírus da Mionecrose Infecciosa), tanto no grau 1, 2 e 3, NHP (Necrose Hepatopancreática), IHHNV (Infecção Viral na Hipoderme e Necrose do Tecido Hematopoético), presença de *fouling* e vibriose no hepatopâncreas e nas brânquias, sendo as amostras da fazenda B, onde havia mais víbrios, as mais comprometidas. No entanto, nenhum surto, que merecesse registro, aconteceu nas fazendas durante a pesquisa.

Portanto, esses fatores podem estar implicados na alteração do tempo de coagulação das amostras de hemolinfa que não exibiram víbrio, uma vez que os animais com as citadas patogenias eram oriundos das mesmas fazendas. Jussila et al. (2001) pesquisando a influência do tempo de coagulação da hemolinfa de *Panulirus cygnus*, George com bacteremia instalada, concluíram que o mesmo era insuficiente para diagnóstico, porém servia para se afirmar sobre a predisposição a doenças.

Das coletas onde as hemolinfas de camarão apresentaram crescimento de *Vibrio* foram isoladas 132 cepas. Deste total, 116 (87,8%) foram identificadas até espécie. Dessas, 11 foram identificadas como *Plesiomonas shigelloides*. O restante (105) foram classificadas em espécies do gênero *Vibrio* (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4- Espécies de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na fazenda A, durante os períodos seco e chuvoso.

Fazenda A	
Seco	
Espécies	Número de isolados
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1
<i>Vibrio harveyi</i>	1
Total	2
Chuvoso	
Espécies	Número de isolados
<i>Vibrio alginolyticus</i>	8
<i>Vibrio cholerae</i>	2
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1
<i>Vibrio mimicus</i>	9
Total	20

Tabela 5- Espécies de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na fazenda B, durante os períodos seco e chuvoso.

Fazenda B	
Seco	
Espécies	Número de isolados
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4
<i>Vibrio harveyi</i>	7
<i>Vibrio mimicus</i>	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
Total	13
Chuvoso	
Espécies	Número de isolados
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	1
<i>Vibrio furnissi</i>	1
<i>Vibrio harveyi</i>	5
<i>Vibrio mediterranei</i>	1
<i>Vibrio metschnikovii</i>	2
<i>Vibrio mimicus</i>	8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4
<i>Vibrio vulnificus</i> B2	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	1
Total	29

Tabela 6 - Espécies de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na fazenda C, durante os períodos seco e chuvoso.

Fazenda C	
Seco	
Espécies	Número de isolados
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1
<i>Vibrio mimicus</i>	1
Total	2
Chuvoso	
Espécies	Número de isolados
<i>Vibrio alginolyticus</i>	9
<i>Vibrio carchariae</i>	7
<i>Vibrio fluvialis</i>	4
<i>Vibrio mediterranei</i>	2
<i>Vibrio mimicus</i>	14
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3
Total	39

A identificação de *Vibrio*, através de provas bioquímicas, é considerada problemática por causa da similaridade fenotípica entre algumas espécies (ALSINA; BLANCH, 1994; OTTAVIANI et al., 2003).

Os gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* formam o segundo principal grupo de bacilos Gram-negativos, fermentativos, anaeróbios facultativos. Antigamente esses microrganismos eram classificados na família Vibrionaceae. Mas, atualmente as técnicas de biologia molecular estabeleceram que esses gêneros possuem apenas uma relação distante e pertencem a três famílias distintas: *Vibrio* e *Aeromonas* são agora classificados nas famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae, respectivamente. *Plesiomonas* foram colocadas na família das Enterobacteriaceae. Porém, apesar dessa reorganização taxonômica, é conveniente considerar essas bactérias em conjunto porque suas epidemiologias e gamas de doenças são similares (MURRAY et al., 2004).

Foram encontradas 13 espécies diferentes de *Vibrio* nas hemolinhas dos camarões analisados. A fazenda, cujos animais apresentaram maior diversidade, foi a B, com 10 espécies detectadas, logo em seguida vem a C, com seis e em último a fazenda A, com apenas cinco espécies diferentes (Tabelas 4, 5 e 6). Gómez-Gil et al. (1998) pesquisando *Vibrio* em amostras de hemolinfa em populações de camarão juvenil (*Penaeus vannamei*) identificaram um número consideravelmente menor quando comparado com o da presente pesquisa, apenas três cepas e duas espécies, sendo duas de *V. parahaemolyticus* e uma de *V. vulnificus*.

A diversidade bacteriana parece sofrer um impacto direto dos fatores ambientais. Na pesquisa de Torsvik et al. (1997) foi constatada uma diversidade genética 250 vezes menor em ambientes de mangue utilizados para aquicultura quando comparado com áreas onde não havia essa atividade.

Segundo Lima (1997), os víbrios dependem diretamente da temperatura do meio. De acordo com Alterthum (2005), cada bactéria possui um ótimo de temperatura para absorção de nutrientes que está intimamente relacionado ao crescimento e desenvolvimento das culturas. A maioria das espécies do gênero *Vibrio* é mesófila apresentando um ótimo de temperatura em torno de 30°C (BAUMANN et al., 1984) fato que as tornam altamente beneficiadas pelas temperaturas no Nordeste.

Nas três fazendas, o período chuvoso favoreceu à diversidade de espécies (Tabelas 4, 5 e 6), discordando de Hervio-Heath et al. (2002) que afirmam que, quando análises são realizadas no período dos meses de verão, a diversidade de *Vibrio* é maior.

A espécie que ocorreu com maior frequência foi *V. mimicus*, tanto na hemolinfa dos camarões do período seco quanto do chuvoso (Figura 8), sendo que as amostras da fazenda C foram onde mais estavam presentes (Tabelas 4, 5 e 6). De acordo com Farmer; Hickman-Brenner (1992) *V. mimicus* pode ser encontrado em águas marinhas, em ostras e camarões. Neste último, principalmente na fase juvenil, sendo freqüentemente isolados em crustáceos considerados saudáveis.

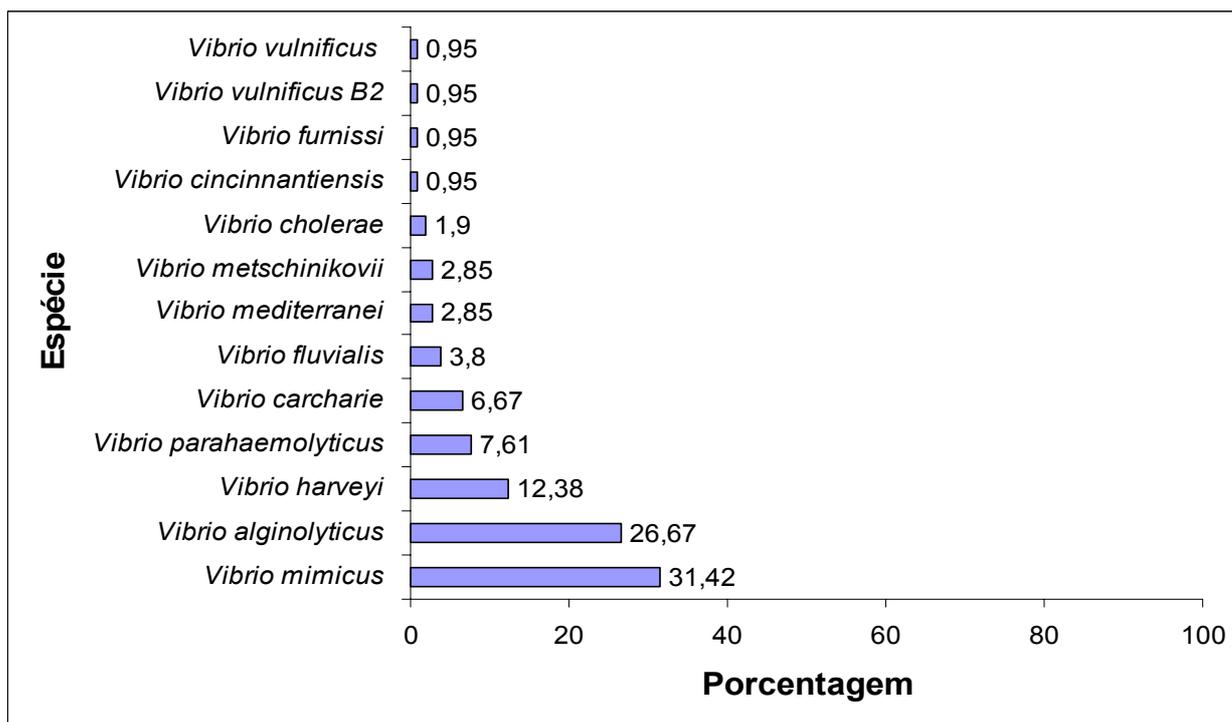


FIGURA 8: Distribuição em porcentagem dos 105 isolados de *Vibrio* oriundos das amostras de hemolinhas dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados nas três fazendas, nos períodos seco e chuvoso.

A segunda espécie mais encontrada foi *V. alginolyticus* (Figura 8). Segundo Liu et al. (2004) este vibrio é considerado como um potente patógeno do camarão *L. vannamei* e de acordo com Li et al. (1999) pode ser frequentemente encontrado na hemolinfa de camarão. Essa bactéria pode, segundo Vandenberghe et al. (1999) ser utilizada como probiótico em pós-larvas de camarão para competir com *V. harveyi*, porém os autores aconselham que para utilizar suas cepas, com este intuito, as mesmas devem passar por uma rigorosa caracterização genotípica. Verschueren et al. (2000) citam que nas fazendas de camarão equatorianas, *V. alginolyticus* é bastante utilizado como próbióticos. Durante a produção de *P. chinensis*, Vandenberghe et al. (1998) encontraram *V. alginolyticus* como espécie bacteriana predominante no estágio larval em camarões saudáveis.

V. harveyi apresentou o terceiro maior percentual de ocorrência no presente estudo (Figura 8), porém, foi detectado apenas nas fazendas A e B. Esse microrganismo é usualmente isolado de animais marinhos considerados doentes (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2003). De acordo com Czyz et al. (2000) sua patogenicidade deve-se à transferência de fatores virulentos para o camarão. Os autores também afirmam que *V.*

harveyi pode ser utilizado como bioindicador de mutações genéticas em amostras de bactérias ambientais.

Algumas espécies de *Vibrio* estão associadas ao fenômeno de luminescência. Quando em grandes quantidades, esse fenômeno pode ser observado tanto nos corpos dos camarões quanto na água em fazendas de cultivo no período noturno. Essas espécies estão relacionadas com dados de mortalidade, que podem variar de insignificante até 100% do cultivo de peneídeos, principalmente nas fases de pós-larva e juvenil (AGUIRRE-GUZMÁN; VALLE, 2000).

De acordo com Gámez et al. (2004), as espécies do gênero *Vibrio* associadas a infecções de camarão têm a propriedade de afetar todos os seus estágios de desenvolvimento, provocando mortalidade de até 100%, após 24 horas do aparecimento da infecção (MORIARTY, 1999).

Vibrio parahaemolyticus foi encontrado apenas nas fazendas B e C (Tabelas 5 e 6), com maior exibição na B. Essa bactéria tende a atacar com maior intensidade camarões no estágio juvenil e adulto (GOMEZ-GIL et al., 2004). Sudheesh; Xu (2001) pesquisando víbrios em um cultivo de *Penaeus monodom*, na China, concluíram que a maioria de suas cepas possui um forte potencial virulento. E, de acordo com 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.

V. charcarie é mais um dos víbrios que estão relacionados a surtos de vibrioses e foi encontrado apenas na fazenda C (Tabela 6). De acordo com Álvarez et al. (2003) ele foi a terceira bactéria mais encontrada (cerca de 17%) em amostras de água destinadas ao cultivo de *L. vannamei* e *L. stylirostris*, em uma fazenda na costa ocidental da Venezuela. Sua presença foi correlacionada a surtos de vibrioses. Nesse mesmo estudo, os autores afirmaram que a diversidade de víbrios foi maior nas amostras de água onde camarões enfermos foram encontrados.

Dentre as demais bactérias encontradas na presente pesquisa, algumas também estão ligadas a vibrioses, tais como *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*, *V. mediterranei*, *V. cincinnatiensis* e *V. fluvialis* (COSTA, 2006). Segundo Vieira et al. (2000), esta última bactéria foi encontrada em 50% das amostras de pós-larvas de camarão em uma larvicultura, e nesse período foram registrados casos de mortalidades.

Tanto *V. vulnificus* quanto o *V. vulnificus* biotipo 2 foram encontrados apenas na fazenda B. Essa bactéria possui alta similaridade fenotípica com *V.*

parahaemolyticus, diferenciando-se apenas pela capacidade de fermentar lactose, o que concorreu para inicialmente ser classificada como “víbrio lactose positivo” (ELLIOT et al., 1995).

Amaro et al. (2005) demonstraram a relação entre a incidência de doenças e um incremento no número de microrganismos patogênicos em enguias. Eles encontraram uma maior quantidade de cepas de *V. vulnificus* biotipo 2 nos organismos de enguias que se encontravam moribundas.

V. cholerae além de estar relacionado a surtos de doenças transmitidas tanto por água quanto por alimentos, também está intrinsecamente ligado a doenças em organismos aquáticos. Hoa et al. (2000) isolaram quatro espécies de *Vibrio* de estágios larvais do camarão *Macrobrachium rosenbergii* cultivado no Vietnã, onde 62% foram de *V. cholerae*, 20% de *V. alginolyticus*, 10% de *V. carchariae* e 8% de *V. mimicus*.

A presença de bactérias do gênero *Vibrio* em organismos aquáticos é preocupante, uma vez que essas bactérias são responsáveis por grandes perdas em cultivos, em todo mundo. Gullian; Rodríguez (2002) afirmam que o desenvolvimento da indústria camaroneira na última década foi marcado pelo surgimento de restrições na produção, entre as quais, a mais importante é a ocorrência de enfermidades infecciosas. Dentre os víbrios, algumas espécies podem ser responsáveis pelo surgimento de enfermidades infecciosas, tais espécies seriam *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Essas espécies são freqüentemente associadas a mortalidades na larvicultura e engorda.

Apesar da detecção de *Vibrio* em algumas coletas e da diversidade em espécies confirmadas nas amostras de hemolinfa, não se pode precisar qual espécie é mais ou menos maléfica ao cultivo de peneídeos, uma vez que a virulência desse gênero bacteriano é muito variável. Entretanto, a presença de cepas patogênicas merece destaque, principalmente, pelo fato de que a hemolinfa, como o sangue humano, deve ser estéril. Se condições desfavoráveis vierem a ser desenvolvidas nos sistemas de cultivo, os camarões se tornarão mais susceptíveis a doenças e ao ataque das bactérias pertencentes a esse gênero microbiano.

5 - CONCLUSÕES

- A presença de *Vibrio* na hemolinfa não teve relação com o seu tempo de coagulação.
- O período chuvoso favoreceu o aparecimento de mais indivíduos com hemolinfas contaminadas com *Vibrio*.
- As contagens de *Vibrio* nas hemolinfas dos camarões oriundos da fazenda A e B no período seco, foram mais altas do que no período chuvoso. No entanto, tanto na B como nas outras fazendas, o percentual de animais contaminados no período chuvoso foi maior do que no período seco.
- A diversidade apresentada pelos víbrios presentes na hemolinfa dos camarões da Fazenda B foi maior que a da fazenda C, e esta foi maior que na fazenda A.

6 - BIBLIOGRAFIA

ABCC. A Carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, Recife, 2004.

ADAMS, A. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. **Fish and Shellfish immunology**, 1, p. 59-70, 1991.

AGUIRREZ-GÚZMAN, G. ¿Los *Vibrio* sp, son agentes patógenos importantes para el cultivo de camarón? **Boletín del Pronalsa**, Universidad Autónoma de Tamaulipas, ano 7, vol. 1, nº 25, p. 1-14, mar. 2004.

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VALLE, A. F. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. **Resent Res Development Microbiology**, vol. 4, p. 333-348, 2000.

ALDAY-SAENZ, V. **Studies on the pathogenesis of *Vibrio* spp. Infection in *Penaeus monodon* Fabricius**, Ph.D thesis, University of Stirling, Scotland, 1994.

ALVAREZ, R. J. D.; AGURTO, C; OBREGÓN, J.; PEROZA, L. Detección de *Baculovirus penaei* y de casos de vibriosis em *L. vannamei* and *L. stylirostris* en uma granja de la costa occidental de Venezuela. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. XIII, n. 4, p. 255-262, 2003.

ALSINA, M.; BLANCH, A.R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 79-85, jan. 1994.

ALTERTHUM, F. Nutrição e Metabolismo Bacterianos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4ª edição – Revista e Atualizada, Atheneu, São Paulo, 2005.

ALVÍDREZ, L. A. P. Estudio preliminar de la composición cuantitativa de bacterias en biopelículas presentes en tanques de cultivo de artemia y de larvas de lagosta roja

Panulirus interruptus. **Boletín del Pronalsa**, Universidad de Sonora, p. 12-15, dez., 2003.

AMARO, C.; BIOSCA, E. G.; FOUZ, B.; ALCAIDE, E.; ESTEVE, C. Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype 2 to eels. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, p. 113-1137, 1995.

AONO, H., MORI, K. Interaction between hemocytes and plasma is necessary for hemolymph coagulation in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 113A (3), p. 301-305, 1996.

ARAÚJO, L. F. P.; GOMES, R. B.; FIGUEIREDO M. C. B.; ROSA, M. F. Qualidade das águas superficiais na área de influência das atividades de irrigação e carcinicultura na bacia do baixo Jaguaribe – Ceará – Brasil, 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.

AUSTIN, B.; PRIDE, A. C.; RHODIE, A. G. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. **Journal Fish Disease**. 26, p. 55-58, 2003.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish, John Wiley e Sons, West Sussex, p. 364, 1987.

BALEBONA, M. C.; ANDREU, M. J.; BORDAS, M. A.; ZORRILA, I.; MORINIGO, M. A.; BORREGO, J. J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.). **Applied and Environmental Microbiology** 64, 4269-4275, 1998.

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, 198: p. 149-168, 2004.

BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W., FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KÜHN, I; MÖLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and

non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.6, p.2748-2753, 1999.

BARRACO, A. M.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões. **Boletim do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura**, Universidade de Santa Catarina, p. 1-80, 2007.

BAUMANN, P.; FURNISSI, A. L.; LEE, J. V. Genus I. *Vibrio pacini* 1854,411. Cap. Section 5. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods, p. 518-538, in: Krieg, N.R.; HOLT, J.G. (eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, p. 964, 1984.

BISHARAT, N.; AGMON, V.; FINKELSTEIN, R.; RAZ, R.; BEN-DROR, G.; LERNER, L.; SOBOH, S.; COLODNER, R.; CAMERON, D. N.; WYKSTRA, D. L.; SWERDLOW, D. L.; FARMER, D. L. Clinical epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteremia in Israel. **Lancet** 354, p. 1421-1424, 1999.

BNDES, **Revista do Banco Nacional Desenvolvimento Social**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 26, p. 309-314, dez., 2006.

BOYD, C.E. **Water Quality in Warmwater Fish Ponds**. Auburn University, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn, EUA, p. 359, 1979.

BRITO, W. O.; SILVA, E. M.; GIRÃO, M. V. D.; COSTA, R. A.; VIEIRA, G.H.F. Estudo de Poluição do Rio Acaraú, Trecho Sobral (CE) e identificação de cepas de *Escherichia coli*. In: Anais IX Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – ENAMA, Curitiba, p.151, 2004.

CARVALHO, R. A. P. L. F.; RUIVO, U. E.; ROCHA, I. P. Mercado Interno: Situação e Oportunidades para o Camarão Brasileiro. **Panorama da Aqüicultura**, p. 22-27, maio-junho, 2007.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Brasil, 2005.

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. Bangkok, 1995.

CHISHOLM, J.R.S.; SMITH, V. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Journal Marine Biology**, Assoc. U.K., 72: p. 529-542, 1992.

COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropical) – Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

COSTA, L. J. P. Análise bacteriológica da água. In: **Dicotomia dos coliformes em organismos fecais e não fecais**. Ed. UFPB, João Pessoa: cap. 15, p. 265–268, 1979.

COLWELL, R. R. Víbrios in the marine and estuarine environment. In: 3th International Marine Biotechnology Conference. Tromsø, Norway, p. 7-12, ago., 1994.

CZYZ, A.; JASTECKI, J.; BOGDAM, A.; SZPILEWSKA, H.; WERGRZYN, G. Genetically Modified *Vibrio harveyi* Strains as Potential Bioindicators os Mutagenic Pollution of Marine Environments, **Environmental Microbiology**, p. 599-605, 2000.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **The Journal of Biological Chemistry**, 272: 28398-28406, 1997.

DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÈRE, E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chiting-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, 113: p.461-469, 2000.

DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. APHA 4th ed., Washington, DC, p. 676, 2001.

DUCKLOW, H. W. Production and rate of bacteria in the oceans. **Biological. Sc.**, 33: p. 494-501, 1983.

DULIART, M. Clotting process in crustacea decapoda. **Biological Review.** 60, 473-498, 1985.

DSMZ. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* Disponível em: <<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>> Acesso em 19 de março de 2008).

ELLIOT, E. L.; KAYSNER, C. A.; JACKSON, L.; TAMPLIN, M. L. *Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: **FDA Bacteriological Analytical Manual.** AOAC International Gaithersburg MD, p. 9.01-9.27, 1995.

ELLIOT, E.L. KAYSNER, C. A., JACKSON, L. & TAMPLIN M. L. *Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Jan. 2001. In: **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, Bacteriological Analytical Manual on line.** FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN, 2001. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html> >. Acesso em 10 de março de 2005.

FARMER, J. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: BALOWS, A.; TRÏPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. Ed. **The prokaryotes**, 2nd, ed., vol. III. Springer-er-Verlag, New York, p. 2990-2991, 1992.

FRELIER, P. F.; LOY, J. K.; REDDINGTON, J. Diferenciação no campo e em laboratório do NHP e da Vibriose. **Revista da ABCC**, Recife, Ano 6, n. 3, p. 55-56, set., 2004.

GÁMEZ, C. I.; GALAVÍZ, J. R. G.; SILVA, L. G.; GARZA, Z. J. M.; VELARDE, M. S. T. Deteccion y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. **Revista Salud Pública y Nutrición.** Edición especial, n. 6, 2004.

GOARANT, C.; MERIEN, F.; BERTHE, F.; MERMOUD, I.; PEROLAT, P. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp pathogenic for shrimp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1145-1151, 1999.

GOMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F.; INGLIS, V.; GUERRA-FLORES, A. L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 1-9, apr., 1998.

GOMEZ-GIL, B.; RODRIGUEZ-SOTO, S.; GARCIA-GASCA, A.; ROQUE, A.; VAZQUEZ-JUAREZ, R.; THOMPSON, L. F.; SWINGS, J. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. **Microbiology**, v.150, p.1769-1777, 2004.

GONDKO, R.; MICHALAK, W.; SWIERCZYNSKI, B. Comparison of the hemolymph content of protein and cations (Ca, Mg, Na, K), clotting time and pH in three crayfish species., **Comparative Biochemistry and Physiology**, 69A, p. 637-640, 1981.

GOPAL, S.; OTTA, S. K.; KUMAR, S.; KARUNASAGAR, I.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 151-159, 2005.

GULLIAN, M.; RODRÍGUEZ, J. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Manejo de enfermedades em camaronês. Contribuciones del CENAIM durante el VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 2002.

HAMEED, A. S. A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. **Aquaculture**, 177, p. 195-204, 1993

HARA-KUDO, Y.; SUGIYAMA, K.; NISHIBUCHI, M.; CHOWDHURY, A.; YATSUYANAGI, J.; OHTOMO, Y.; SAITO, A.; NAGANO, H.; NISHINA, T.; NAKAGAWA, H.; KONUMA, H.; MIYAHARA, M.; KUMAGAI, S. Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan, 2003.

HENNIG, O. L.; ANDREATA, E. R. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967). **Aquaculture**, v. 164, p. 167-172, 1998.

HERNÁNDEZ, J. Z., **Manual Purina de Bioseguridad no Cultivo de Camarões Marinhos**. Paulínia, São Paulo, p. 1-35, ago. 2000.

HERVIO-HEATH, D.; COLWELL, R. R.; DERRIEN, A.; ROBERT-PILOT, A.; FOURNIER, J. M.; POMMEPUY, M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. **Journal Applied Microbiology**, v.92, p.1123-1135, 2002.

HOA, T. T. T.; OANH, D. T. H.; PHUONG, N. T. Characterization and Pathogenicity of *Vibrio* Bacteria Isolated from Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Hatcheries: Part 1: Isolation and Identification of *Vibrio* spp from Larval Stages. Proceedings of the 2000 annual workshop of JIRCAS Mekong delta Project, 2000.

HOLLIS, D. G.; WEAVER, R. E.; BAKER, C. N.; THORNSBERRY, C. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. **Journal Clinical Microbiology** 3, p. 425-431, 1976.

HOLMSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTROM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B. E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 255-266, 2003.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, p-128-150, 2005.

JIANG, S. C.; FU, W. Seasonal abundance and distribution of *Vibrio cholerae* in coastal waters quantified by a 16S-23S intergenic spacer probe. **Microbiology Ecology**, 42, p. 540-548, 2001.

JIRAVANICHPAISAL, P., MIYAZAKI, T., LIMSUWAN, C., SOMJETLERDCHALERN, A., Comparative histopathology of vibriosis in black tiger prawn, *Penaeus monodon*. In:

Asian Fisheries Society Eds., 2nd Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Asian Fisheries Society, p. 14, 1993.

JOHANSSON, M. W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, 191: p. 45-52, 2000.

JORGENSEN, B. B. Processes at the sediment-water interface. In: B. Bolin and R.B. Cook, (eds.) The major biochemical cycles and their interactions, p. 477-515. Wiley, New York, 1983.

JUSSILA, J.; MCBRIDE, S.; JAGO, J.; EVANS, L.H. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus Cygnus*, George). **Aquaculture**, p. 185-193, 2001.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. JR. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. **Bacteriological Analytical Manual**, 8th ed. Revision A, 1998. Chapter 9. Substantially rewritten and revised May 2004. In: Bacteriological Analytical Manual *on line*. Chapter 9, *Vibrio*, 2004. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html#authors>>. Acesso em: 06 ago., 2006.

KAYSNER, C. A.; HILL, W. E. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water. In: WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; OLSVIK, O. (Ed). ***Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives**. Washington: ASM, p. 27-40, 1994.

KITANI, H. Morphology of post-larvae of the whiteleg shrimp *L. vannamei*. **Nippon Suisan Gakkaishi**.v. 59 n.2. p. 223-227, 1993.

KREGER, A.; LOCKWOOD, D.; Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. **Infection Immunology**, 33, p. 583-590, 1981.

LARSEN, J. L., FARID, A. F.; DALSGAARD, I. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in marine and estuarine bathing areas in Danish coast. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene B**, 173, p. 338-345, 1981.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; LEAÑO, E. M.; PANER, M. G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. **Aquaculture**, v.164, p. 337-349, 1998.

LEE, K.K.C., YI-LING, LIU, P.C. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, p. 180-192, 1999.

LI, J; J, YIE; FOO; R. W. T.; LING, J. M. L.; XU, H.; WOO, N. Y. S. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. **Marine Pollution Bulletin**, **39**, p. 245-249, 1999.

LIGHTNER, D. V. Diseases of penaeid shrimp. In: P. V. McVey (ed.), **CRC Handbook of Mariculture**, CRC Press, Boca Ratón, p. 393-486, 1993.

LIGHTNER, D. V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Review of Science and Technology**, 579-601, 1996.

LIGHTNER, D.V. **Shrimp diseases**. In: Sindermann, C.J. (ed.). *Disease Diagnosis and Control in North American Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, p. 10–77, 1977.

LIMA, F. C. Víbrios marinhos II. Víbrios não coléricos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 49, p. 8-13, 1997.

LIMA, A. S. **Vibrio em camarão e na água de três fazendas de carcinicultura do Estado do Ceará**. Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará, ano de obtenção: 2007.

LIN, C. K. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand, p. 13-23. In: BROWDY, C. L. e HOPKINS, J. S. (ed) *Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, **Aquaculture**. World Aquaculture Society. Baton Rouge, La. 1995.

LIU, C.-H.; YEH, S.-T.; CHENG, S.-Y.; CHEN, J.-C. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, n. 2, p.151-161, feb., 2004.

LOTZ, J. M. Effect of host size on virulence of Taura Virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Diseases of aquatic Organisms*, p. 45-51, 1997. Disponível em: <<http://www.fact.sheet.for.litopenaeus.vannamei>>. Acesso em: 8 de abril 2006.

MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira em 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e, 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**. Ano 7, n. 1, Recife, mar., 2005.

MARTINS, P. C. C. **Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará**. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2003.

MATSIOTA, P.; NAUCIEL, C. *Vibrio alginolyticus* wound infections after exposure to seawater in a air crash. **European Journal of Clinical Microbial Infections Diseases** 12, p. 474-475, 1993.

MENEZES, F. G. R. **Diversidade de *Vibrio* spp em estuários no estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura**. Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará, ano de obtenção: 2005.

MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. BELL, C.R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. (eds), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999.

MOTES, M. L.; DePAOLA, A.; COOK, D. W.; VEAZEY, J. E.; HUNSUCKER, J. C.; GARTHRIGHT, W. E.; BLODGETT, R. J.; CHIRTEL, S. J. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and Environmental Microbiology**, 64, p. 1459-1465, 1998.

MURRAY, P. R.; ROSGYHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. **Microbiologia Médica**, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*. 4ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 30, p. 265-271, 2004.

NARCHI, W. **Crustáceos**. Editora Polígono. EDUSP. São Paulo, p. 116, 1973.

NISHIGUCHI, K. M.; NAIR, S. V. Evolution of symbiosis in the *Vibrionaceae*: a combined approach using molecules and physiology, p. 2019, 2003.

NOGA, E. J., ARROLL, T. A., FAN, A.. Specificity and some physico-chemical characteristic of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. **Fish Shellfish Immunology**, 6: p. 403-412, 1996.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüicultura**, v. 12, n. 72, p. 23-33, 2002.

Oakey, H. J.; CULLEN, B. R.; OWENS, L. The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML. **Journal Applied Microbiology** 9, p. 1089-1098, 2002.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: **Foodborne Bacterial Pathogens**, Ed. Doyle, M. P., New York: Marcel Dekker, p. 569-600, 1989.

OTTAVIANI, D.; MASINI, L.; BACCHIOCCHI, S. A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1227-1284, 2003.

OWENS, L.; MUIR, P.; SUTTON, D.; WINGFIELD, M. **The pathology of microbial diseases in tropical Australian Crustacea**, p. 165-172. In: SHARIF, M.;

SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (ed.) Diseases in Asian aquaculture I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 1992.

PINHIERO, M. M. A. A.; HENBLING, N. J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii*. **Tecnologia para produção de camarões**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ed. Valenti, Brasília, p.383, 1998.

PEREIRA, A. M. L; SANTOS, M. L. **Relatório do treinamento em patologia de camarões marinhos**, realizado no Instituto Tecnológico de Sonora, Obregón – México, Parnaíba, 2003.

PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. **Penaeoid and sergestoid shrimp and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera**. Ed. Museum Paris, p. 1-79, 1997.

ROCHA, I. P. Impacto Sócio - econômicos e Ambientais da Carcinicultura Brasileira: Mitos e Verdades. **Revista da ABCC**. Ano 7, n. 4. Recife, dez., 2005.

ROCHA, I. P. Agronegócio do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, Recife, p.23. abr., 2000.

ROCHA, P. I.; ROCHA, D. M. Cultivo de camarão marinho ocupa posição de destaque no contexto pesqueiro. Carcinicultura: produção, demanda e processo tecnológico com responsabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da ABCC**, Ano 9, n. 1, Recife, p.16-22, set., 2007.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; OLIVEIRA, E. G.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, vol. 34, n. 5, Uberaba-SP, set.-out., 2001.

RUANGPAN, L.; KITAO, T. *Vibrio* bactéria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, **Jornal Fish Disease**,14: p. 383-388, 1991.

RUBY, E. G.; GREEMBERG, E. P.; HASTINGS, J. W. Planktonic marine luminous bacteria species distribution in the water column. **Applied and Environmental Microbiology**, 38, p. 302-306, 1980.

RUPPERT, E. E.; BARNER, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**, 6ª edição, Ed. Roca, São Paulo, p. 659-759, 1996.

SANTOS, M. L.; CARVALHO R.; ALENCAR R.; NETO, A. P.; FONSECA, C. S.; PEREGRINO, L. P.; ROCHA, I.; RODRIGUES, J. ABCC - **Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho**. Programa de biossegurança na fazenda de camarão marinho. 1ª edição, p. 1-63, jan., 2005.

SHEHANE, D. S.; SIZEMORE, R. K. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. **Journal Applied Microbiology**, v.92, p.322-328, 2002.

SMITH, V. J., JOHNSTON, P. A. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 101C (3), p. 641-649, 1992.

SOARES, J. B.; CASEMIRO, A. R. S.; ALBUQUERQUE, L. M. Metabolismo bacteriano – Fermentação de carboidratos e outras provas bioquímicas. In: **Microbiologia Básica**. Fortaleza: Ed. UFC, p. 180, 1991.

SONG, Y. L.; YU, C.I.; LIEN, T.W.; HUAN, C.C.; LIN, M.N. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, p. 317-331, 2003.

SOTO-RODRIGUES, S.; ROQUE, A.; LIZARRAGA-PARTIDA, M. L.; GUERRA-FLORES, A. L.; GOMEZ-GIL, B. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. **Disease of Aquatic Organism**, 53, p. 231-240, 2003.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**, 6ª edição, Ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo, p. 484-503, 2000.

SUDHEESH P.S.; XU H. S. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. **Aquaculture**, 196, p. 37-46, 2001.

SUNG, H.H.; YANG, Y.L.; SONG, Y. L.. Enhancement of microbicidal activity in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulation. **Journal of Crustacean Biology**, 16: p.278-28, 1996.

TAIT, J., Types of crustacean blood coagulation. **Journal of Marine Biology Assoc. U. K.** 9, p. 191-198, 1911.

THOMPSON, R. J.; RANDA, M.A.; MARCELINO, L. A.; TOMITA-MITCHELL, A.; LIM, E.; POLZ, M. F. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4103-4110, 2004.

TORSVIK, V. L., DAAE, F. L., GOKSØYR, J., SORHEIM, R.; OVREAS, L. Diversity of bacteria in soil and marine environments. In: Martins, M.T., Sato, M.I.Z., Tiedje, J.M., Hagler, L.C.N., Dobereiner, J., Sanchez, P. S. **Progress in Microbial Ecology. Proceedings of Seventh International Symposium on Microbial Ecology**, Santos, São Paulo, Brasil. 1997.

VADSTEIN, O, REINERTSEN, H. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. **Fish Farming Technology**. Balkema Publishers, p. 69-75, 1993.

VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population Genetic of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation, **Marine Biotechnology**, p. 475-484, 2004.

VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-ARZARENA, R.; RIVERA, G.; BOLLAND A.; BALLADARES, M.; GOMES-GIL, B.; CALDERON, J.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2592-2597, 1999.

VANDENBERGHE, J. Y.; LI, L.; VERDONCK, J.; LI, H. S. SWINGS, J. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae and post-larvae in Chinese shrimp hatcheries, **Aquaculture**, 169, p. 121-132, 1998.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Abundance of potentially pathogenic microorganisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. **Microbiology Research**, v. 158, p. 299– 308, 2003.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E. F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 4, p. 179-182, jul.-aug., 2004.

VIEIRA, R. H. S. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C.; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M.; CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp. e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arquivo de Ciências do Mar**, v.33, p.107-112, 2000.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G. SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.64, n.4, p.655-671, 2000.

ZANOLO, R. Enfermidades na aquicultura: perspectivas e importância do uso de produtos veterinários registrados para aticidade. **Revista da ABCC**, Ano 8, n. 2, Recife, p. 42-44, jun., 2006.

WEST, P. The human pathogenic vibrios. A public health update with environment perspectives. **Epidemic Infection**, v. 103, p. 1 – 34, 1989.

7 – ANEXOS

ANEXO A – Prova de coloração de Gram (Soares et al. 1991).

Nesta prova são utilizadas cepas isoladas a partir de ágar triptonsoja (TSA) inclinado com 24 horas de incubação, onde são seguidos os passos descritos a seguir:

1. Inicialmente faz-se um esfregaço fino.
2. Com auxílio de uma pinça, tomar uma lâmina de microscópio imersa em álcool.
3. Colocar uma pequena gota de água destilada sobre a lâmina na parte central.
4. Retirar assepticamente, com uma agulha de inoculação, uma porção do crescimento da cultura a ser analisada.
5. Espalhar a massa celular na gota e em seguida fixar a preparação, passando a lâmina um pouco acima da chama do bico de bunsen (sem superaquecê-la).
6. Cobrir o esfregaço com cristal violeta por 1 minuto.
7. Lavar com água corrente.
8. Cobrir o esfregaço com lugol por 1 minuto.
9. Descorar com álcool 95%.
10. Lavar com água corrente.
11. Contra-corar com safranina 0,25% por 20 segundos.
12. Lavar com água corrente e secar, absorvendo a água com lenço de papel.
13. Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão.

OBS: Microrganismos Gram positivos: azuis ou violetas

Microrganismos Gram negativos: vermelhos

ANEXO B – Meios de Cultura e Reagentes**1- SOLUÇÃO DE ÁGUA PETONADA ALCALINA (APA) 1% DE CLORETO DE SÓDIO**

- Peptona-----	10,0 g
- Cloreto de sódio-----	10,0 g
- Água destilada-----	1000 mL

Após a dissolução dos ingredientes, a solução foi distribuída em volumes de 9 mL, em tubos 15 x 160mm, ou 225 mL em erlenmeyer. Esterilizados em autoclave por 121°C por 15 minutos. Posteriormente, os mesmos foram resfriados e mantidos em geladeira até o momento de sua utilização. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

2 – AGAR TRIPTONA-SOJA + 1% DE CLORETO DE SÓDIO (TSA)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante. Logo, 40g do produto desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada acrescidos de 1 g de NaCl. A mistura era agitada e fervida até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição inclinada até a solidificação do meio, de forma a se ter uma base de aproximadamente 2 cm de altura e uma parte inclinada. Após a solidificação do meio, eram mantidos em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

3 - AGAR TIOSSULFATO-CITRATO-BILE-SACAROSE (TCBS- DIFICO)

De acordo com as recomendações do fabricante, foram dissolvidos por aquecimento, 89,0 gramas do meio desidratado em 1000mL de água destilada. O meio foi fervido até sua total dissolução. Em seguida, distribuído, ainda quente, em volumes de 15 mL, aproximadamente, em placas de Petri esterilizadas e após sua solidificação, as placas foram utilizadas. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

4 - ÁGAR MULLER-HINTON COM 1% DE NaCl

Suspensão de 28,5g de Muller-Hinton e 7,5g de NaCl em 750mL de água destilada. O meio foi aquecido até a sua dissolução. Autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Distribuição de 15mL por placas de Petri estéril.

5 - PROVA DA PRODUÇÃO DE CITOCROMO-OXIDASE:

- N,N,N',N' - ttrmetil-p-fenileno-diamina (SIGMA)-----1,0 g
- Água destilada-----100 mL

O reagente foi dissolvido em água e em seguida acondicionado em frasco escuro e conservado em freezer.

6 - PROVA PARA HIDRÓLISE DA ARGININA E DESCARBOXILAÇÃO DA LISINA E ORNITINA + 1% DE CLORETO DE SÓDIO.

Base

- Peptona-----5,0 g
- Extrato de Levedura-----3,0 g
- Glicose-----1,0 g
- Cloreto de sódio-----10 g
- Púrpura de Bromocresol-----0,02 g
- Água destilada-----1000 mL

Para cada 1000 mL de caldo base adicione 1,25 g de L-lisina, L-arginina e L-ornitina. Ajuste o pH para 7,8 com NaOH 1N. Distribua 5 mL em tubos com rosca, identifique os tubos por grupos de aminoácidos e controle. Esterilize os tubos com as tampas frouxas a 121°C por 10minutos. Aperte as tampas para estocar a 4°C. Após inocular, adicione uma camada (1 mL) de óleo mineral estéril em cada tubo. Incube a 35°C e examine diariamente durante 4 dias. Inicialmente a coloração do meio muda de

púrpura para amarelo. Se ocorrer a descarboxilação do aminoácido a coloração do meio volta para púrpura/violeta (alcalino) – reação positiva. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

7 - CALDO TRIPTONA A 1,3,6,8 E 10% DE CLORETO DE SÓDIO (Prova do Halofilismo)

- Caldo Triptona-----	10 g
- Cloreto de sódio-----	10,30,60,80 e 100,0g
- Água destilada-----	1000 mL

Procedeu-se a dissolução da triptona e das respectivas concentrações de cloreto de sódio em um determinado volume de água destilada. Posteriormente, os volumes foram completados a 1000 mL pela adição de água destilada. Os meios foram então, distribuídos em porções de 10,0 mL em tubos de 16 x 160mm e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. Paralelamente foi preparado o mesmo meio, porém sem adição de cloreto de sódio. Ajustar pH para 7,8.

8 - TESTE DE VOGES-PROSKAUER (VP) + 1% de CLORETO DE SÓDIO

Segundo orientações do seu fabricante, 17,0 g do meio MR-VP desidratado (DIFCO) e 10 g de cloreto de sódio foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada em porções de 5 mL em tubos de 15 x 150mm e, em seguida, a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram estocados em geladeira a 4°C. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

9 - TESTE DA HIDRÓLISE DO ORTO-NITROFENIO-B – D-GALACTO-PIRANOSÍDEO (ONPG):

- ONPG-----	0,08g
- Água destilada-----	15,0 mL

- Solução Fosfato monobásico 1M, pH 7 -----5,0 mL

Dissolva o ONPG em água destilada a 37°C. Adicione 5,0 mL da solução de fosfato monossódico. A solução deve ser incolor. Armazene em frasco escuro a 4°C. Antes de usar, aqueça parte da solução de ONPG a 37°C suficiente para o número de testes. Não reutilize a solução aquecida.

10 - PROVA DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS:

Base

- Peptona-----10,0 g
 - Extrato de Carne-----3,0 g
 - Cloreto de sódio-----10,0 g
 - Púrpura de Bromocresol-----0,04 g
 - Água destilada-----1000 mL

Para cada 1000 mL de caldo base adicione 5 g de manitol, manose, arabinose, glicose, lactose e sacarose separadamente. Ajuste o pH para 7,8 com NaOH 1N. Distribua 5 mL em tubos com rosca, identifique os tubos por grupos de carboidratos e controle. Esterilize os tubos com as tampas frouxas a 121°C por 10 minutos. No caso dos carboidratos arabinose, e manose a esterilização deve ser através de filtração. Em cada tubo de glicose deve ser adicionado antes de esterilizar um tubo de Durham. Após inocular, adicione uma camada (1 mL) de óleo mineral estéril em cada tubo. Incube a 35°C e examine diariamente durante 7 dias. A positividade da prova ocorre com a mudança do meio muda de púrpura para amarelo. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

11 - TESTE DE PRODUÇÃO DO INDOL

Foram dissolvidos por aquecimento, 36,0 g de meio SIM desidratado (DIFCO) e 10 g de cloreto de sódio em 1000 mL de água destilada. Em seguida, o meio foi distribuído em porções de aproximadamente, 4,0 mL em tubos de 12 x 120 mm seguindo-se à esterilização em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após a

autoclavação os tubos foram mantidos em temperatura ambiente em posição vertical, até a solidificação do meio. Em seguida, mantido em geladeira até sua utilização. O pH final deste meio foi de 7,8 +/- 0,2.

12 - PREPARO DO CORANTE CRISTAL VIOLETA (2%) (Coloração de Gram)

Modificado por Hucker

-Solução A: Cristal violeta (85% puro)-----2,0 g
 Álcool Etilico (95%)-----20 mL

-Solução B: Oxalato de amônio-----0,8 g
 Água destilada-----80 mL

Misturar as soluções A e B.

13 – PREPARO DO CORANTE LUGOL (Coloração de Gram)

- Iodo cristalizado-----1,0 g
- Iodeto de potássio-----2,0 g
- Água destilada-----300 mL

14 – PREPARO DO CORANTE SAFRANINA (0,25 %) (Coloração de Gram)

- Safranina (2,5% em álcool a 96%)-----10 mL
- Água destilada-----100mL

15 - REAGENTES DO VP (ICMSF, 1978)

1 - Solução alcoólica de alfa-naftol a 5%

Foram dissolvidos 5,0 g de alfa-naftol (Merck) em 100 mL de álcool absoluto. O reagente foi acondicionado em frasco escuro e mantido a temperatura ambiente.

2- Solução aquosa de hidróxido de potássio a 40%

Foram dissolvidos 40,0g de hidróxido de potássio (Merck) em 100 mL de água destilada. O reagente foi acondicionado em frasco escuro e conservado a temperatura ambiente.

16 - REAGENTE ONPG – Solução de Fosfato Monossódico 1,0 pH 7,0

- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O-----	6,9 g
- Água destilada-----	45,0 mL

Em 30 g de NaOH em balão volumérico adicione 100 mL de água destilada. Antes de adicionar a água coloque o balão em banho com gelo para evitar o superaquecimento.

Dissolva o NaH₂PO₄.H₂O em 45 mL de água destilada. Adicione 3 mL da solução de NaOH a 30% e ajuste para o pH 7,0. Complete o volume para 50 mL com água destilada. Armazene a 4°C.

17 – SOLUÇÃO DE CITRATO DE SÓDIO (10%).

Suspensão de 10g de Citrato de Sódio em 100 mL de água destilada esterilizada em erlenmeyer.