



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio* spp. NA HEMOLINFA DE
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) CULTIVADOS EM
FAZENDAS NO ESTADO DO CEARÁ**

EDIRSANA MARIA RIBEIRO DE CARVALHO

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
FEVEREIRO/2009**

**QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio* spp. NA HEMOLINFA DE
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) CULTIVADOS EM
FAZENDAS NO ESTADO DO CEARÁ**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO
REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA.**

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
FEVEREIRO/2009**

C322q Carvalho, Edirsana Maria Ribeiro de
Quantificação e identificação de *Vibrio* spp. na hemolinfa de camarões
Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931), cultivados em fazendas no Estado
do Ceará / Edirsana Maria Ribeiro de Carvalho, 2009.
90 f. ;il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira
Área de concentração: Microbiologia do Pescado
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências. Depto. de Engenharia de Pesca , Fortaleza, 2009.

1. Sacarose 2. Camarão 3. carcinicultura I . Vieira, Regine Helena
Silva dos Fernandes (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Curso de
Mestrado em Engenharia de Pesca III. Título

CDD 639.2

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação será permitida, desde que seja conforme as normas científicas

Edirsana Maria Ribeiro de Carvalho

Dissertação aprovada em __/__/____

Profa. Dra. REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA
Orientadora

Profa. Dra. SILVANA SAKER SAMPAIO
Membro

Prof. Dr. ERNESTO HOFER
Membro

“Aprender generosamente significa não aprender com egoísmo, buscando a aquisição de conhecimento para vaidade pessoal ou para vangloriar-se de um amanhã de triunfos exteriores, esquecendo que muito do aprendido foi ensinado para evitar sofrimento e permitir a passagem pelos trechos difíceis no longo da caminhada.”

Raumsol

DEDICO

Aos meus pais, Edson e Ana, e ao meu esposo Adriano, meus maiores incentivadores, que acreditaram no meu potencial, e me apoiaram nos momentos em que mais precisei para concluir esse trabalho.

Às minhas irmãs, Ana Cláudia e Andrea, pelo carinho, apoio, motivação e cumplicidade.

Eu amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A dissertação que agora apresento resultou de longa caminhada percorrida ao longo desses dois anos que se passaram tão rapidamente. Os méritos que ela possa ter, devem-se às contribuições de tantas pessoas que proporcionaram testemunhos de vários gêneros. Foram eles que a tornaram possível, expresso a todos, a minha mais profunda gratidão.

A Deus, pelas bênçãos derramadas nos momentos bons e principalmente no conforto nas horas mais difíceis da caminhada.

Meu maior agradecimento é dirigido a meus pais, Edson e Ana, por terem sido meu porto seguro em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência dos meus próprios valores.

Às minhas irmãs, Ana Cláudia e Andrea, que sempre acreditaram no meu potencial.

Ao meu marido, Adriano Cecatto, por ter compartilhado cada dia, cada noite, cada momento bom ou ruim e por cuidar de mim com tanto carinho, por sempre me desejar boa noite não importando o horário... Meu amor, eu te amo!

Aos meus tios, Lúcia, Marlene, Nasita e Neto, que sempre me apoiaram nos momentos em que mais precisei.

Aos meus avós e tios (*in memoriam*), mesmo não estando fisicamente presentes sei que olharam por mim.

Aos meus grandes amigos, Jack e Ricardinho, por terem sido eficientes em tudo que precisei. Muito obrigada!

Às minhas grandes amigas, Anahy, Cristiane, Camila, Gleire, Karla, Norma, Oscarina, Renata, que sempre me apoiaram; pelos momentos de alegria e descontração e até mesmo me chamando carinhosamente de Bebeinnn, Pintinho e Edi. A vocês meu eterno agradecimento e admiração.

Ao Luís (Buda), pela execução do mapa e pelo carinho sempre demonstrado.

Aos amigos do Mestrado, Lilian, Walter, Nayana, Eliana, Rômulo, que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

Ainda dentro dos Amigos, dois que o são e serão para sempre meus grandes amigos, e que por isso merecem um lugar especial nestes agradecimentos: Cecília e Diego.

À professora Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, por toda ajuda durante esse trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado.

À secretária do Mestrado Rogéria Maria de Oliveira Setubal por sua paciência e compreensão.

Dedico também um agradecimento à banca examinadora desta Dissertação (Dr. Ernesto Hofer e Dra. Silvana Saker Sampaio). Os membros compreendidos serão sempre meus eternos professores e amigos. Eu devo considerável parte de minha qualificação a essas pessoas tão especiais.

Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) pelo uso de suas instalações.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudo no curso.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Mais do que a qualquer outra pessoa, a Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, minha orientadora, merece agradecimento especial. Sempre disponível para retirar dúvidas, sempre preocupada em seguir o meu trabalho e as minhas preocupações, foi sempre um porto seguro em dar coragem quando por vezes tudo parecia ruir, sem esquecer também todo o apoio e carinho fora do âmbito desta dissertação.

Canção da hemolinfa

Regine Limaverde

Meu nome é hemolinfa
e sou o sangue dos camarões.
Corro livre em seu corpo
e sou seu vigia, seu guardião.
Se algum microrganismo penetra
forte em suas entranhas,
sei que ele ficará doente.
Por essa razão, protejo-o
guardo-o, e posso vê-lo feliz.
Sou a guarda permanente
dos ambientes.
Maldigo os que sujam os rios,
os que sem consciência,
sem saber, com ódio,
sujam o meio onde meu amo
vive e nada feliz.
Bendito os que estudam,
os que respeitam as água.
Deles, será o reino dos céus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Carcinicultura mundial.....	5
2.2 Cultivo de camarão no Brasil.....	8
2.3 <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
2.4 Sistema imunológico do camarão.....	17
2.5 Ambiente de cultivo x patógeno	20
2.6 <i>Vibrio</i>	24
2.6.1 Características principais	24
2.6.2 <i>Vibrio</i> na carcinicultura.....	25
2.6.3 Principais víbrios no camarão	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Locais de coleta.....	33
3.2 Processamento das amostras	34
3.2.1 Teste de coagulação da hemolinfa	34
3.2.2 Extração da hemolinfa.....	35
3.3 Contagem e Isolamento de <i>Vibrio</i> spp.....	36
3.3.1 Semeadura das amostras	36
3.3.2 Contagem e Isolamento de <i>Vibrio</i> spp	37
3.4 Identificação morfológica e bioquímica das espécies de <i>Vibrio</i> spp.....	38
3.4.1 Coloração de Gram	38
3.4.2 Motilidade	39
3.4.3 Identificação bioquímica de cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	39
3.4.3.1 Prova de produção de citocromo-oxidase	39
3.4.3.2 Produção de indol.....	40
3.4.3.3 Hidrólise da arginina e Descarboxilação de lisina e ornitina.....	40
3.4.3.4 Fermentação de carboidratos	41

3.4.3.5 Prova do ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo).....	41
3.4.3.6 Tolerância ao NaCl.....	42
3.4.3.7 Prova do Voges-Proskauer.....	42
3.5 Testes adicionais.....	43
3.5.1 Teste de redução do Nitrato.....	43
3.5.2 Teste da liquefação da gelatinase.....	43
3.5.3 Crescimento a 4°C, 35° C e 40°C.....	44
3.5.4 Resistência a ampicilina 10 μ g.....	44
3.5.5- Resistência ao O/129 10 μ g.....	45
4. TESTES ESTATÍSTICOS.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. ANEXO.....	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Evolução da produção mundial de camarão capturado cultivado.....	7
FIGURA 2 – O camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
FIGURA 3 – Evolução do desempenho da carcinicultura brasileira (1998-2007).....	10
FIGURA 4 – Vista lateral de um camarão peneídeo.....	13
FIGURA 5 – Ciclo de vida dos camarões peneídeos.....	14
FIGURA 6 – Níveis de patogenicidade na aqüicultura.....	22
FIGURA 7 – Localização das fazendas situadas no estuário do Rio Acaraú e no Rio Jaguaribe.....	33
FIGURA 8 – Teste de coagulação da hemolinfa.....	35
FIGURA 9 – Extração da hemolinfa.....	36
FIGURA 10 – Fluxograma da análise da hemolinfa.....	37
FIGURA 11 – Gráfico do comportamento das Contagens Padrão em Placas (CPP) dos vibrios em Unidade Formadora de Colônias por mililitro (expressas em Log de UFC/mL) em amostras de hemolinfa de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> com 4 g e 8 g, coletados em quatro fazendas de cultivo, durante o período de chuva.....	56
FIGURA 12 – Gráfico do comportamento das Contagens Padrão em Placas (CPP) dos vibrios em Unidade Formadora de Colônias por mililitro (expressas em Log de UFC/mL) em amostras de hemolinfa de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> com 4 g e 8 g, coletados em quatro fazendas de cultivo, durante o período de estio.....	57

FIGURA 13 – Distribuição em porcentagem dos 114 isolados de *Vibrio* das amostras de hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com 4 g e 8 g no período chuvoso..... 62

Figura 14- Distribuição em porcentagem dos 91 isolados de *Vibrio* das amostras de hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com 4 g e 8 g no período de estio..... 62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Contagens padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log₁₀) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinfa de camarão com o peso de 4 g, no período chuvoso..... 48

TABELA 2 – Contagens padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log₁₀) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinfa de camarão com o peso de 8 g, no período chuvoso..... 48

TABELA 3 – Contagens padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log₁₀) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinfa de camarão com o peso de 4g, no período de estio..... 49

TABELA 4 – Contagens padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log₁₀) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinfa de camarão com o peso de 8 g, no período de estio..... 50

TABELA 5 - Cepas de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) com 4 g e 8 g de peso, cultivados nas quatro fazendas, durante o período chuvoso..... 60

TABELA 6 – Cepas de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa oriundas dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) com 4 g e 8 g de peso, cultivados nas quatro fazendas, durante o período estiagem..... 61

RESUMO

As infecções bacterianas em camarões são causadas, freqüentemente, por bactérias do gênero *Vibrio*. O presente estudo teve por objetivo quantificar e identificar *Vibrio* na hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivado em fazendas no Estado do Ceará, Brasil. Relacionou-se também o tempo de coagulação das hemolinfas com as contagens de *Vibrio*. Foram realizadas 16 coletas em quatro fazendas (A, B, C e D), sendo oito para camarões com 4 g, e oito para camarões com oito gramas. As coletas foram realizadas nos períodos sazonais: chuvoso e estiagem. Perfazendo um total de 480 amostras, sendo 240 para camarões com 4 g e 8 g cada, respectivamente. Os valores da Contagem Padrão em Placas (CPP) de víbrios totais, de víbrios Sac+ e Sac-, nas amostras de hemolinfa dos camarões com 4g, no período chuvoso, variaram de: $2,74 \times 10^4$ a $28,70 \times 10^6$ UFC/mL (est.); de $< 6,0$ a $14,64 \times 10^6$ UFC/mL e de $< 6,0$ a $12,72 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Para a hemolinfa dos camarões com 8 g os valores obtidos foram: $1,68 \times 10^4$ a $15,18 \times 10^6$ UFC/mL (est.), de $< 6,0$ a $1,8 \times 10^5$ UFC/mL e de $< 6,0$ a $15,18 \times 10^6$ UFC/mL (est.), respectivamente. No período de estiagem esses valores para a hemolinfa dos camarões de quatro gramas, foram: $9,0 \times 10^2$ (est.) a $5,40 \times 10^4$ UFC/mL víbrio total; $< 6,0$ a $1,71 \times 10^4$ UFC/mL (Sac-) e de $< 6,0$ a $5,40 \times 10^4$ UFC/mL (Sac+). Para os camarões com 8 g a contagem de Víbrio total foi de $9,0 \times 10^2$ (est.) a $2,0 \times 10^7$, de $< 6,0$ a $4,02 \times 10^6$ UFC/mL (Sac-) e de $< 6,0$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/mL (est.) (Sac +). Os resultados mostram que os índices de colônias de *Vibrio* Sac- e Sac+ foram maiores no período chuvoso do que no de estiagem. Não houve relação entre o tempo de coagulação e as contagens de *Vibrio* na hemolinfa dos camarões. As espécies que predominaram nos períodos estudados foram: *V. coralliilyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio pelagius II*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mediterranei*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus B1*.

ABSTRACT

Most of shrimp bacterial infections are caused by *Vibrio* bacteria genus. This study aims to quantify identify *Vibrio* in the hemolymph of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* cultivated in farms in State of Cear, Brazil. Related is also the time of coagulation of hemolymph with counts of *Vibrio*. Sixteen samples were performed on four farms (A, B, C and D), eight shrimps with 4 g, and eight with eight grams shrimps. The collections were made in seasonal periods: rainy and drought. A total of 480 samples, and 240 to shrimps with 4 g and 8 g each, respectively. The values in the Standard Plate Count (SPC) of total vibrio, *Vibrio* Suc+ and Suc- in the hemolymph of shrimp samples with 4 g, in the rainy season ranged from: 2.74×10^4 to 28.70×10^6 CFU/mL (est.), <6.0 to 14.64×10^6 CFU/mL and <6.0 to 12.72×10^6 CFU/mL, respectively. For hemolymph of shrimp with 8 g of the SPC and the total *Vibrio* Suc+ and Suc- ranged from 1.68×10^4 to 15.18×10^6 CFU/mL (est.), <6.0 to 1.8×10^5 CFU/mL and <6.0 to 15.18×10^6 CFU/mL (est). During the period of drought for these values of shrimp haemolymph of four grams, were: 9.0×10^2 (est.) to 5.40×10^4 CFU mL total *Vibrio*, <6.0 to 1.71×10^4 CFU/mL (Suc-) and <6.0 to 5.40×10^4 CFU/mL (Suc+). For shrimp with 8 g a total *Vibrio* count was 9.0×10^2 (est.) CFU/mL to 2.0×10^7 , <6.0 to 4.02×10^6 CFU/mL (Suc-) and <6.0 to 2.0×10^7 CFU/mL (est.) (Suc+). The results show that the rates of colonies of *Vibrio* Suc- and Suc+ were higher in the rainy season than in the drought. There was no relationship between the time of coagulation and the counts of *Vibrio* in the hemolymph of shrimps. The species that predominated in the period were: *V. coralliilyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio pelagius II*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mediterranei*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus* B1.

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio* spp. NA HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS EM FAZENDAS NO ESTADO DO CEARÁ

Edirsana Maria Ribeiro de Carvalho

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão marinho teve início no Brasil na metade dos anos setenta, adquirindo um caráter empresarial no final da década de oitenta. Entretanto, só a partir dos anos noventa, com a introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*, o desenvolvimento processou-se em bases mais sólidas da rápida adaptação dessa espécie às condições dos estuários brasileiros, e em ritmo comercial acelerado, após o ano de 1996, quando então alcançou condições favoráveis no mercado (ABCC, 2002). Segundo Maia; Nunes (2003), nos últimos anos o *L. vannamei* tem tido um papel fundamental no desempenho dos camarões no Brasil, permitindo que o país se destaque entre os principais exportadores do crustáceo.

A carcinicultura brasileira embora tenha iniciado o ano de 2007 com muitas incertezas, sem perspectivas de recuperação econômica, tanto pelos efeitos das viroses como da política cambial, chegou ao final do ano mostrando claros sinais de superação dos seus principais problemas, inclusive, apontando para uma retomada do crescimento já a partir de 2008 (ROCHA; ROCHA 2007). Com isso, a carcinicultura marinha atravessa um momento de grande desenvolvimento tecnológico em termos globais com avanços tecnológicos, nas áreas de genética, alimentação, reprodução, doenças, e no aprimoramento

do sistema de manejo operacional. O Brasil nos últimos anos aparece como líder nesse processo com destaque principalmente nos indicadores de produtividade. Entretanto, esse desenvolvimento pode levar à diminuição da qualidade do ambiente de cultivo e, em consequência, à redução da resistência imunológica dos camarões provocada pelo estresse e ao surgimento de viroses e outras enfermidades oportunistas (BOYD, 1999).

O sistema imunológico eficiente e a coagulação do sangue são fatores de extrema importância para a sobrevivência tanto de vertebrados como para de invertebrados. A coagulação da hemolinfa nos camarões consiste em uma resposta do sistema inato imune, que evita vazamentos locais das lesões e difusão dos invasores, tais como bactérias ao longo do corpo (THEOPOLD et al., 2004).

Algumas bactérias são comumente encontradas nos camarões e fazem parte dos ambientes marinho e/ou estuarino. Contudo, as modificações das condições naturais do meio, a densidade de estocagem, o aumento da matéria orgânica resultante de restos de alimentos, dejetos e animais mortos, pode desequilibrar a comunidade bacteriana, estimulando assim o crescimento de patógenos oportunistas nos ambientes de cultivo (GUZMÁN; VALLE, 2000).

A carcinicultura mundial especialmente na larvicultura e a engorda, vem experimentando perdas significantes na produção provocada por patógenos bacterianos do gênero *Vibrio*. Surtos de vibrioses são geralmente causados por desequilíbrio na população das bactérias desse gênero que se encontram naturalmente nos ecossistemas estuarino e marinho (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004).

O controle do estado de saúde dos camarões cultivados se torna importante não só do ponto de vista bioecológico, mas também do ponto de

vista econômico-financeiro. Os principais indicadores de desempenho zootécnico no cultivo de camarão, tais como taxa de crescimento, taxa de mortalidade e conversão alimentar são afetados direta ou indiretamente pelas doenças (MARTINS, 2006).

Os efeitos negativos dos microrganismos na carcinicultura culminam com o aparecimento de enfermidades. O controle não se restringe ao patógeno, mas estende-se ao manejo da operação de cultivo. Dessa forma, a carcinicultura pode ser considerada como uma cadeia de elos interligados: o camarão, o ambiente de cultivo e os patógenos. Portanto, o fortalecimento do sistema de produção depende de cada um dos elos que compõem essa cadeia (HERNÁNEZ; NUNES, 2001).

O combate às enfermidades infecciosas exige o emprego de medidas preventivas e/ou decisões cujo sucesso irá depender do verdadeiro conhecimento do patógeno e de seu mecanismo de ação, para que assim, possam ser estabelecidas as estratégias de combate. Uma das formas de minimizar a extensão e o impacto das doenças em um cultivo é o manejo adequado. O estresse parece ser a maior causa do surgimento de enfermidades nas fazendas de carcinicultura, estando associadas a uma série de eventos relacionados com deficiência nutricional, variáveis ambientais, densidade de estocagem entre outros, que podem influenciar o sistema de defesa dos indivíduos (GESTEIRA, 2006).

Com bases nas informações citadas acima, o presente estudo teve como objetivos:

1. Quantificar as Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) de *Vibrio* nas amostras de hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei*.

2. Quantificar, isolar e identificar as cepas de *Vibrio* sacarose positivas e negativas nas amostras extraídas da hemolinfa dos camarões.
3. Relacionar o tempo de coagulação da hemolinfa dos camarões com as contagens de *Vibrio*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carcinicultura mundial

O cultivo do camarão marinho teve sua origem histórica no Sudoeste da Ásia, onde pescadores artesanais construíam diques de terra nas zonas costeiras para o aprisionamento de pós-larvas selvagens que cresciam nas condições naturais prevalentes. Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo e de reprodução, a atividade passou a ser praticada comercialmente, apresentando bons resultados e uma conseqüente expansão mundial, passando a constituir grande importância econômica e social em diversos países, principalmente nos emergentes. Gerada pela estagnação da pesca e pela crescente demanda do camarão, a carcinicultura vem constituindo uma grande alternativa para suprimento da demanda interna e externa (SOUZA FILHO et al., 2003).

Segundo Arana (1999), a carcinicultura teve início no século XV. Contudo, somente a partir de 1930, Século XX, é que foram realizados os primeiros experimentos para a produção da desova da espécie *Marsupenaeus japonicus*, em laboratório. Na década de 70, com o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, a produção comercial das espécies de camarões teve grande impulso, sendo suas conseqüências refletidas até os dias atuais.

Os camarões marinhos peneídeos representam aproximadamente um terço das espécies de grande importância comercial no mundo, simbolizando mais de 80% das capturas (BALDWIN et al., 1998).

O processo de produção na carcinicultura é dividido em duas fases: a larvicultura, que compreende a produção de pós-larvas em laboratório; e a

engorda, que consiste no crescimento dos animais até a obtenção de índices aceitáveis para a comercialização. Ainda em algumas propriedades existe um processo de melhoramento, onde são selecionados animais para a reprodução, baseando-se em caracteres zootécnicos e na sanidade apresentada (FRANCISCO, 2003).

O crescimento do mercado mundial de pescados vem sendo sustentado cada vez mais pelo cultivo das espécies, sendo que a carcinicultura se afirma enquanto alternativa de produção de alimento rápida e em grande escala (ROCHA; MAIA, 1998).

A carcinicultura marinha é vista com uma das atividades agroindustriais mais atrativas economicamente, já que nos últimos quatro anos, este setor registrou uma taxa média de expansão territorial da ordem de 20 % ao ano (ROCHA, 2000). Os números do desempenho da carcinicultura a nível mundial são bastante expressivos. Segundo a FAO (2007), a produção desse setor cresceu de 917.273 t, em 1996, para 2.733.134 t, em 2005, correspondendo a um incremento médio de 13,38% ao ano e representado 45% da produção mundial de camarão de 6.082.600 t, enquanto a produção da pesca extrativa nesse mesmo período cresceu apenas 3,44% ao ano, saindo de 2.522.122 t, em 1996, para 3.349.346 t, em 2005 (Figura 1).

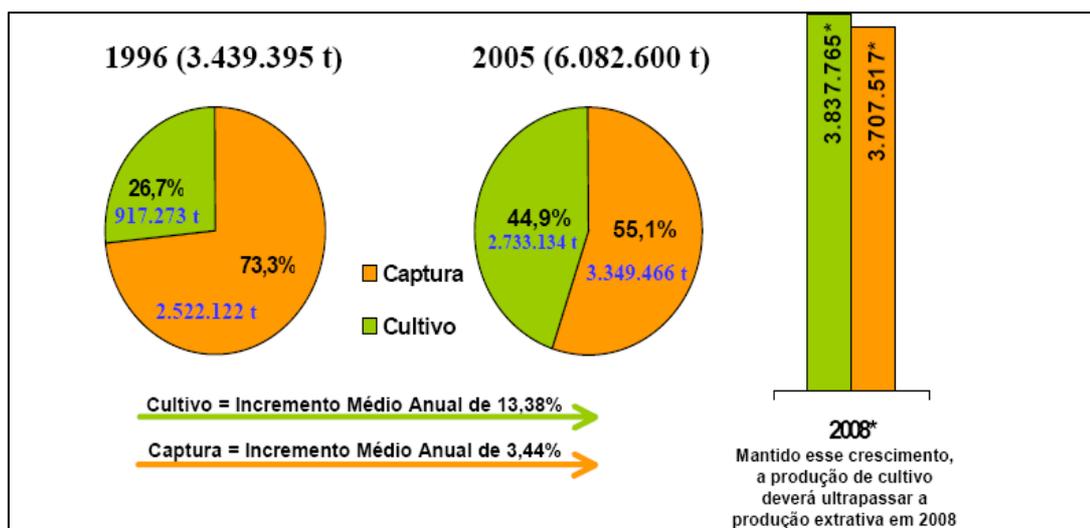


Figura1. Evolução da produção mundial de camarão capturado x cultivado. Fonte: FAO (2007).

Na análise dos últimos dez anos, o crescimento nas importações de camarão da União Européia, no período de 1997 a 2006 foi de 83,28% para o volume e 59,60% para o valor. Em 2006, os principais países importadores da União Européia foram: Espanha (178.116 t), Dinamarca (133.268 t), França (104.871 t), Reino Unido (89.064 t), Itália (72.680 t), Bélgica (70.608 t), Holanda (50.522 t), Alemanha (38.762 t), Suécia (26.426 t) e Portugal (19.791 t). A participação do camarão cultivado nas importações citadas acima é da ordem de 90% para os Estados Unidos, 70% para Europa e 80% para o Japão, com tendência de crescimento, não só pelo aspecto da competitividade em relação ao camarão cultivado, mas acima de tudo, pelo aspecto da qualidade da rastreabilidade, da sustentabilidade, da responsabilidade ambiental e do compromisso social. Atributos esses, que pela sua importância, cada vez mais estão sendo exigidos e condicionados pelos consumidores (ROCHA; ROCHA, 2007).

Atualmente o camarão é o produto da aquicultura que mais se destaca no cenário mundial. Sua demanda nos países desenvolvidos é expressiva, com

tendência de crescimento em médio e longo prazos. A elevada rentabilidade proporcionada pelo seu cultivo atrai empreendedores de vários continentes, especialmente nos países periféricos. (FAO, 2002)

2.2 Cultivo de camarão no Brasil

O cultivo de camarões marinhos no Brasil teve início na década de 70 com a introdução da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*, incentivando posteriormente a entrada de outras espécies como *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* e *Penaeus monodon* (BUENO, 1990). Todavia, a prática empresarial do cultivo de camarão marinho teve início nos anos 80, utilizando a espécie exótica *M. japonicus*. Em meados dessa década, houve necessidade de pesquisas que possibilitassem o alcance de uma produtividade economicamente aceitável e ante a inaptidão do *M. japonicus* às baixas salinidades, a carcinicultura brasileira redirecionou seus objetivos para as espécies nativas *Farfantepenaeus subtilis*, *Litopenaeus schmitti*, *F. brasiliensis* e *F. paulensis* (MAA, 1999). No entanto, nenhuma dessas espécies mostrou-se interessante do ponto de vista comercial. Atualmente, devido ao desempenho e rentabilidade demonstrados pelo *L. vannamei* (Figura 2), nos cultivos semi-intensivos, essa espécie se consolidou como a única viável sob o ponto de vista técnico-econômico, sendo empregada provavelmente em 100% das fazendas do Brasil (ROCHA; RODRIGUES, 2004). Por se tratar de espécie exótica, seu processo de adaptação exigiu demandas importantes, como a auto-suficiência de pós-larvas e industrialização de rações de ótima qualidade, melhoria dos processos tecnológicos, inclusive técnicas de cultivo mais aprimoradas e melhor apresentação do produto final (ROCHA, 2005).



Figura 2. O camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

Foto: Edirsana Carvalho.

O Brasil conseguiu nos últimos anos a liderança mundial em produtividade e, em 2003, a maior produção do camarão *Litopenaeus vannamei* do hemisfério ocidental. Nesse mesmo ano verificou-se a primeira queda na produção e na produtividade brasileiras dos últimos sete anos, que foi de 15,8% e 25,9%, respectivamente (RODRIGUES, 2005).

Segundo a ABCC (2005), ocorreu um decréscimo da produção em 2004 com relação a 2003 devido aos altos índices pluviométricos na região, ocasionando desequilíbrio no ambiente aquático, o que afetou a qualidade da água, acarretando o estresse no camarão, abrindo caminhos para enfermidades. No mesmo ano, com ação *anti-dumping* imposta pelos Estados Unidos contra o camarão brasileiro, associado a alguns fatores adversos e especialmente à forte desvalorização do dólar americano, esse setor, cuja base comercial era o mercado internacional, perdeu competitividade nas exportações, tendo como resultado uma redução na produção e naturalmente, de forma mais expressiva, nas exportações. A atual crise sofrida pelo setor

entre 2004 e 2007, decorrente da falta de prioridades e de apoio governamental, contribuiu para uma diminuição do crescimento exponencial médio de 71% ao ano, registrada entre 1997 (3.600 t) e 2003 (90.180 t). Em 2004 a produção foi reduzida para 75.904t, se registrando uma nova queda na produção em 2005 (65.000 t). A partir do ano de 2006 a atividade se estabilizou mantendo a produção em um patamar de 65.000 t. (ROCHA; ROCHA, 2007) (Figura 3).

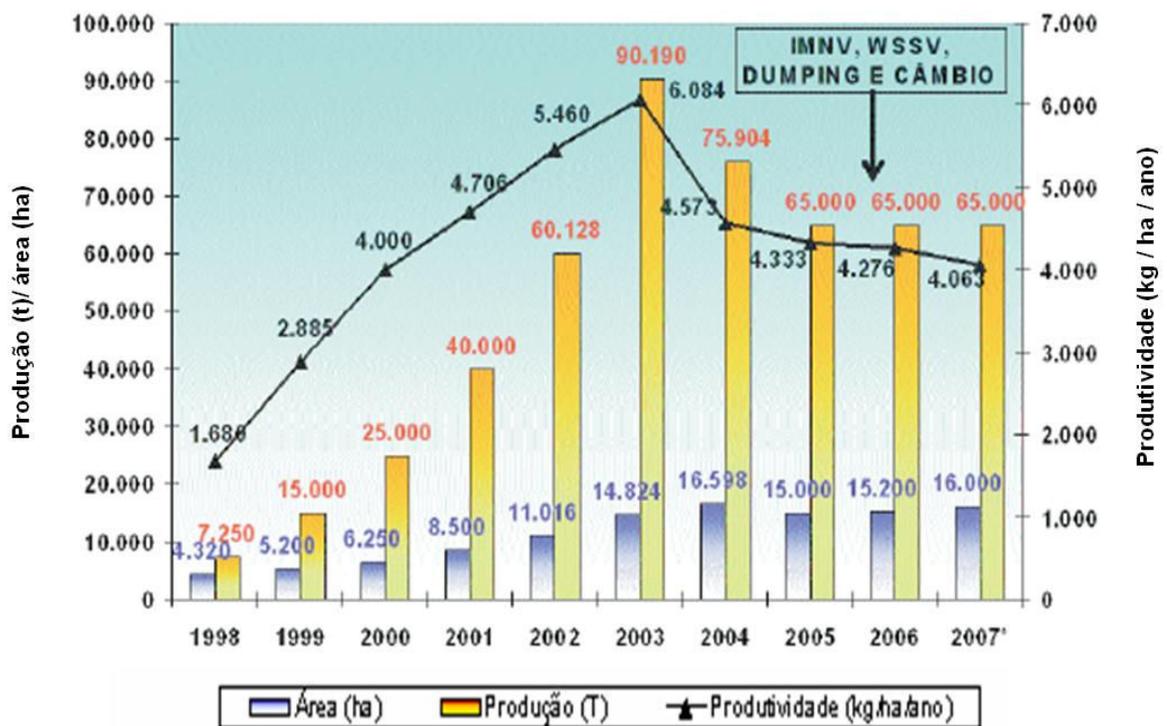


Figura 3. Evolução do desempenho da carcinicultura brasileira (1998-2007).
Fonte: ABCC (2007).

Aproximadamente 96% da produção brasileira de camarão estão concentradas na Região Nordeste; a Região Sul representa 3% do total, impulsionada principalmente pelo Estado de Santa Catarina (SOUZA FILHO et al., 2003). Segundo Borghetti; Ostrensky; Borghetti (2003), o Brasil, progressivamente, ganhou posições no *ranking* internacional. Em 2001 ocupou a 19ª posição em produção e a 13ª em receitas geradas. Essa colocação

representou um evidente progresso, mas a produção do Brasil ainda era menor em relação a lugares com condições climáticas ou disponibilidade de áreas e de água muito menores, como, por exemplo, Nova Zelândia, Egito, Reino Unido e Canadá, entre outros.

Na América do Sul, em 2004 foram produzidas 172.105 t, das quais o Brasil, contribuiu com 44%. No *ranking* brasileiro, a Região Nordeste assumiu o primeiro lugar, detendo 93% da produção. Nessa região, somando 1,89 empregos diretos por hectare, de empregos, com 1,86 empregos indiretos, chegou-se a 3,75 empregos gerados por hectare de viveiro em produção. Esta atividade alcançou níveis de emprego bem superiores quando comparados aos números gerados pela agricultura irrigada que alcança cerca de 2,14 empregos gerados por hectare (SAMPAIO; COSTA, 2003). Apesar desses números terem mostrado a excelente rentabilidade da atividade, ocorrem certas dificuldades que são: a exportação do produto *in natura*, com restrições de mercado cada vez maiores para este tipo de camarão; carência de investimentos em ciência e tecnologia nas áreas de nutrição e prevenção de doenças; falta de linhas de financiamento para o custeio da produção; e as restrições e deficiências da ação *antidumping* (LENOCH, 2004).

2.3 *Litopenaeus vannamei*

Os crustáceos contam com aproximadamente 38 mil espécies, ocorrendo nos ecossistemas terrestres e aquáticos (dulcícola, marinho e salobro), das quais cerca de 8.500 são integrantes da Ordem Decapoda (BOWMAN; ABELE, 1982).

Litopenaeus vannamei pertence ao grupo dos Artrópodes que têm simetria bilateral: triblásticos, celomados, protostômios. Essa espécie diferencia-se dos demais Artrópodes por apresentarem um exoesqueleto mais espesso e rígido (VALENTI, 1998).

Os camarões peneídeos possuem o corpo dividido em três regiões: a cabeça, também chamada de céfalon, o tórax ou péreion e o abdômen ou pléon. Cada uma dessas regiões é composta por somitos ou segmentos onde são inseridos os apêndices. A cabeça e o tórax dos peneídeos estão fundidos em uma estrutura única chamada cefalotórax, localizada na porção anterior do animal, onde morfologicamente três estruturas se destacam: a) a carapaça, que protege as brânquias e os demais órgãos vitais; b) os olhos pedunculados, que se articulam com a cabeça e são móveis; e c) o rostro, uma espécie de “espinho” que serve como estrutura de defesa contra predadores. O abdômen constitui-se na parte posterior do corpo. Estende-se desde a parte final do cefalotórax até a porção final do animal, onde se encontra o telson; possui seis segmentos ou somitos, que vão reduzindo de diâmetro, paulatinamente, até chegar ao último que é um pouco mais largo que os anteriores (característica dos peneídeos). Além disso, o abdômen concentra a maior parte da musculatura dos camarões (Figura 4) (BARBIERE-JR; OSTRENSKY-NETO, 2002).

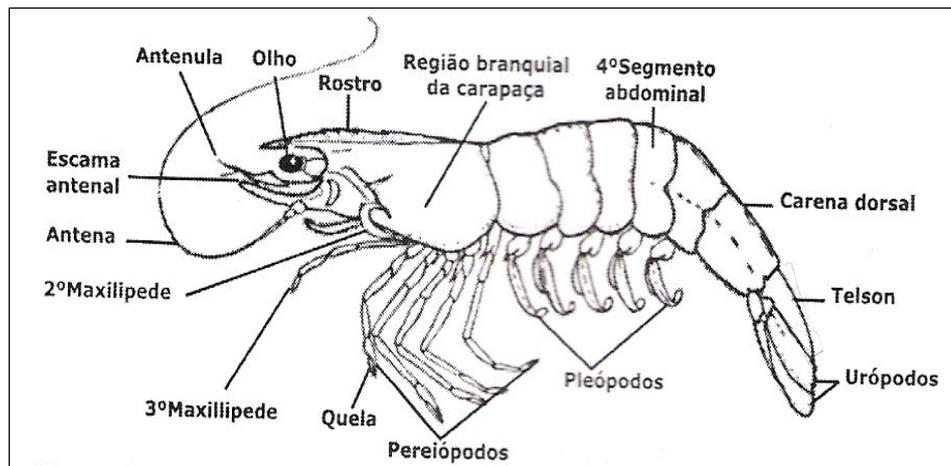


Figura 4. Vista lateral de um camarão peneídeo.
 Fonte: BARBIERE-JR; OSTRENSKY-NETO (2002).

O camarão *Litopenaeus vannamei* possui tamanho médio de 230 mm e pertence à família Penaeidae da zona litorânea, estando associado às águas costeiras rasas e estuarinas. Os camarões marinhos se reproduzem normalmente em alto-mar. Durante a fase reprodutiva, as fêmeas desovam sucessivamente, produzindo um número considerável de ovos, que pode variar de 100.000 a 500.000 por desova, dependendo da espécie e do tamanho da fêmea (IGARASHI, 1995).

Com a eclosão dos ovos nascem os náuplios, possuindo cinco subestágios (N1 a N5), fase que dura 36 h e na qual eles não se alimentam. Em seguida, vem à fase de protozoéia, com três subestágios (Z1 a Z3) com alimentação fundamentalmente à base de fitoplâncton. Ao término deste estágio, as larvas mudam o hábito alimentar tornando-se mais carnívoras, sendo que esse estágio tem uma duração de aproximadamente quatro dias. Após o estágio de protozoéia, vem o estágio de misis com três subestágios (M1 a M3), passando o zooplâncton a ser o principal alimento e o fitoplâncton consumido em menor quantidade. O estágio de misis tem uma duração de três dias. A metamorfose se completa na passagem do subestágio misis III para

pós-larva I, em que os animais já possuem todas as características básicas de um camarão adulto e procuram o ambiente estuarino de menor salinidade e de maior abundância de alimento para garantir o crescimento. Os animais passam aproximadamente quatro meses no ambiente estuarino e voltam para o mar ainda imaturos sexualmente. A maturidade sexual se completa no 6° mês, quando estão prontos para a cópula e completam seu ciclo de vida (Figura 5) (VINATEA, 2004).

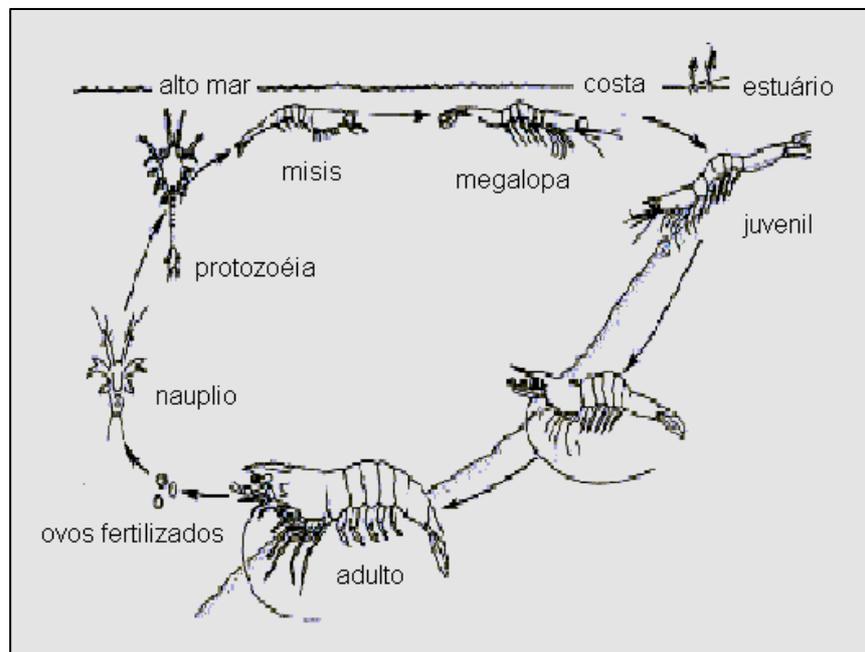


Figura 5. Ciclo de vida dos camarões peneídeos. Fonte: VAN DE BRAAK (2002).

Segundo Nunes (2004), *Litopenaeus vannamei* é atualmente a única espécie de camarão marinho cultivada comercialmente no Brasil. Isso se deve à sua boa adaptação, rusticidade e ao seu rápido crescimento em todas as fases do processo produtivo. As pós-larvas dessa espécie são hoje produzidas em larga escala no País e, durante a engorda aceitam facilmente rações peletizadas, tolerando uma ampla variação na salinidade da água, de 0,5 até

65 unidades práticas de salinidade (‰). Este peneídeo, em função de sua típica coloração, apresenta uma alta aceitação nos mercados internacionais.

De acordo com Rosenberry (1998), os camarões peneídeos possuem um grande potencial na aquacultura intensiva no mundo, assim como no setor industrial que envolve a atividade. As principais espécies de camarões cultivadas são:

a) *Penaeus monodon*: Conhecido como camarão-tigre-gigante, é o principal produto da Ásia, com 50% da produção mundial. Essa espécie pode medir 36,3 cm e pesar 130 g, possui uma rápida taxa de crescimento sob condições ideais de cultivo. Tolerar altas salinidades, porém sua reprodução em cativeiro é baixa como também sua taxa de sobrevivência.

b) *Penaeus vannamei*: Conhecido como camarão branco ocidental, é a espécie mais cultivada na América Latina e Estados Unidos, e representa 25% da produção mundial em relação a todos os camarões cultivados. Pode medir no máximo 23 cm e possui uma taxa de crescimento uniforme. Tolerar taxas de salinidades entre 15 ‰ e 40 ‰. As larvas podem ser obtidas em laboratório em grandes quantidades.

c) *Penaeus chinenses* ou *Penaeus orientalis*: Conhecido como chinês, essa espécie é produzida em várias regiões da China. Esse camarão tem comprimento máximo de 18,3 cm e pode crescer em baixas temperaturas (16-25°C), em comparação com outras espécies tais como *P. vannamei* e *P. monodon*. As rações para o cultivo dessa espécie necessitam de altas taxas de proteínas que variam entre 40 e 60% o que torna seu cultivo caro.

d) *Penaeus stylirostris*: Conhecido como camarão azul ocidental, essa espécie é produzida na América do Norte, Nova Zelândia, Oceania, e em

outros países. Pode atingir cerca de 23 cm de comprimento e as condições para seu cultivo são semelhantes ao do *Penaeus vannamei*.

e) *Penaeus japonicus*: Chamado de camarão kumura, essa espécie é nativa da Índia e do sudoeste do Oceano Pacífico. O Japão e a Austrália são os principais países que cultivam este organismo. Essa espécie chega a atingir entre 25 e 30 cm e se desenvolve bem em temperaturas baixas (10°C).

f) Outras espécies de potencial econômico: O camarão *Penaeus schmitti* é cultivado em Cuba, com ótimos resultados. Essa espécie pode atingir 23,5 cm de comprimento. Já as espécies *P.merguiensis* e *P. indicus* são cultivadas em sistema extensivo em fazendas do sudoeste da Ásia. Essas espécies têm atraído a atenção do mundo, recentemente, porque toleram a baixa qualidade da água e podem crescer em altas densidades. Chegam a atingir de 24 cm e 22,8 cm, respectivamente.

Dentre os camarões citados, destaca-se o camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), que é nativo do Pacífico Leste e foi trazido para o Rio Grande do Norte em 1981 para cultivo em viveiros (TAVARES, MENDONÇA, 1996), porém não apresentou bons resultados durante anos. Somente a partir do início da década de 90 a espécie começou a apresentar resultados positivos, passando a ser cultivada ao longo de, praticamente, toda a costa brasileira (TAVARES, 2003). O camarão-branco *Litopenaeus vannamei* é a segunda espécie de peneídeo mais cultivada. Esse crustáceo que habita locais de 0 a 72 m de profundidade, distribui-se desde o leste do Pacífico, no Norte do México, até Tumbes, na região do Peru (PERÉZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997).

De uma forma geral, os peneídeos são classificados como omnívoros. No entanto, verifica-se que em algumas espécies os adultos podem ser também

detrítivos e/ou carnívoros. Em aqüicultura, nutrientes (proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas, minerais e água) encontrados nas rações para animais, incluindo as dos camarões, são utilizados para a construção e manutenção dos tecidos e o suprimento de energia. De acordo com Cuzon et. al. (2004), os níveis de proteínas exigidos para o desenvolvimento dos camarões variam em cada fase da vida. Em pós-larvas, esses níveis variam em torno de 30%-35% e em juvenis de 30%.

2.4 Sistema imunológico do camarão

O sistema imune compreende todos os mecanismos pelos quais os organismos se defendem de invasores. Ele também é responsável pela remoção de células mortas, renovação de determinadas estruturas e memória imunológica. É ativo contra células alteradas, que surgem como resultado de mitoses anormais e atua em uma rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, celulares e também moleculares (MACHADO et al., 2004). Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do antígeno, quer seja um organismo agressor (patógeno) ou outro material estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação direcionada a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Segundo Lightner (1992), há um grande interesse no conhecimento dos mecanismos de defesa do sistema imune dos crustáceos, devido a necessidade de se reduzir o efeito do patógeno ao hospedeiro, para assim se obter o controle e a prevenção de doenças. Avanços no conhecimento do sistema e o estabelecimento de padrões imunológicos de referência podem

contribuir para o progresso da carcinicultura, levando a uma melhora na produção através do monitoramento do estado de saúde dos animais.

Os crustáceos têm um sistema imune inato caracterizado pela ausência de imunoglobina e memória imunológica, mas bastante eficiente para protegê-los e preservá-los da invasão de patógenos. Os hemócitos dos crustáceos representam um papel principal na resposta imune, realizando funções como fagocitose, encapsulação, formação de nódulo e mediação de citotoxicidade (JOHANSSON et al., 2000). Certos tipos de hemócitos têm sido associados a várias proteínas, por exemplo, o profenoloxidase (proPO), sistema responsável pela encapsulação e melanização (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989). Nos camarões, além da cutícula rígida que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos, a integridade corpórea dos crustáceos é mantida por 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; PERAZZOLO; ROSA; 2004).

Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos crustáceos são: (1) coagulação da hemolinfa; (2) melanização mediada pelo sistema profenoloxidase; (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 fluida e também por ser capaz de atingir diretamente todos os tecidos dos crustáceos (IWANAGA; LEE, 2005). Portanto, o mecanismo de coagulação da hemolinfa é

essencial para a resposta imune dos camarões, pois é um dos fatores essenciais que irá apontar possibilidade da presença ou não de patógenos.

A compreensão das reações imune celulares dos crustáceos depende, de forma crucial, da identificação e caracterização das suas células imunocompetentes ou hemócitos. Apesar de não haver ainda uma classificação uniforme e universalmente aceita para estas células, três tipos de hemócitos são usualmente descritos em crustáceos: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (HGG) (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990).

Os hemócitos dos crustáceos são produzidos em tecidos hematopoiéticos, geralmente constituídos por lóbulos celulares densos, situados na região epigástrica (região dorsal e dorso-lateral do estômago e do intestino anterior) (VAN DE BRAAK et al., 2002). A falta de uniformidade na identificação dos hemócitos deriva principalmente do fato dessas células serem muito lábeis e reativas, alterando rapidamente suas características morfofisiológicas *in vitro*, o que torna seu estudo ainda mais difícil do que aquele dos leucócitos dos vertebrados. A ativação dos hemócitos dos crustáceos resulta geralmente em seu espraiamento e degranulação, havendo a liberação de uma grande variedade de efetores imunológicos para o plasma. Nos últimos anos houve um grande progresso no estudo destas células, devido ao desenvolvimento de várias soluções anticoagulantes específicas, além de meios capazes de estabilizar adequadamente os hemócitos *in vitro* (BACHÈRE, 2000).

2.5 Ambiente de cultivo x patógeno

A busca pela saúde do sistema de produção a ser adotado tem início na concepção do projeto quando o produtor planeja o sistema de produção que será empregado. O que deve ser levado como ponto fundamental neste momento é a seleção do local e a forma de implantação do projeto. Outros aspectos devem ser avaliados, tais como: os ecológicos do local, principalmente a quantidade e a qualidade da água que será utilizada e a condição edafo-climática. Com esses cuidados são evitados, em determinadas circunstâncias, problemas patológicos crônicos aos animais cultivados nesses ambientes (MARTINS, 2006).

No ambiente de cultivo os organismos relacionam-se igualmente com o seu meio e com os outros organismos aquáticos, tais como patógenos e predadores. Nesses ambientes, os patógenos podem atingir níveis muito elevados, colocando em risco a sobrevivência de toda a população cultivada. Os organismos de cultivo terão maiores ou menores chances de contrair uma doença infecciosa (ou não infecciosa) se tiverem alguma alteração ou deficiência genética, fisiológica, imunológica ou adaptativa, isto é, de base ecológica (VINATEA, 2004). Entre as principais causas de perdas na larvicultura de peneídeos estão aquelas de origem bacteriana. A promoção de um ambiente benéfico e bacteriologicamente estável são de fundamental importância para um cultivo bem sucedido (LORENZO, 2004). Vários são os métodos utilizados para se combater esse problema que incluem profilaxia sanitária, desinfecção, quimioterapia, com ênfase no uso de antibióticos, e vacinas contra doenças específicas. Porém muitas dificuldades estão associadas a estes métodos, como exemplo a terapia antibiótica que provoca

um aumento na resistência microbiana e acumulação de resíduos nos tecidos de peixes (COOK et al., 2002).

Uma doença pode ser considerada como resultado final de uma interação complexa do animal ou hospedeiro com o seu ambiente e o patógeno propriamente dito (SNIESZKO, 1973). O resultado esperado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e o ambiente pode variar de acordo com alterações em qualquer um dos círculos ou ainda nos três. Sob determinadas condições, o hospedeiro (ou hospedeiros) e o patógeno potencial podem co-existir com efeito adverso mínimo ou mesmo nulo. Assim, a simples presença de um dado patógeno em uma amostra de camarão submetida a um diagnóstico laboratorial não implica necessariamente em doença. Em peneídeos há exemplos de organismos epicomensais, inócuos nas brânquias, que causam doenças em situações de cultivos em alta densidade ou em condições ambientais que podem levar ao estresse.

Segundo Thrusfield (2004) o rompimento do equilíbrio na interação dos fatores mencionados e a consequente resposta do peneídeo por meio da expressão da doença têm, geralmente, além do determinante primário com maior ação na indução da doença (o vírus, por exemplo), outros fatores que predispoem ou reforçam o desenvolvimento da enfermidade.

As enfermidades na carcinicultura são categorizadas em três níveis, baseando-se no seu nível de patogenicidade e perigo para a indústria de camarão (Figura 6). A categoria 3 (C3) envolve os patógenos que causam um mínimo impacto à produção, contudo podem gerar deformidades e alterações na aparência física dos camarões. Na categoria 2 (C2) estão os patógenos que causam ameaça a produção, podendo afetar a produtividade dos cultivos, o crescimento e a sobrevivência dos camarões. A categoria 1 (C1) inclui os

patógenos que causam mortalidade em massa em populações cultivadas de camarões, representando uma ameaça à sobrevivência da indústria em uma determinada área geográfica. É nessa categoria onde está inclusa a maioria das doenças virais dos camarões marinhos (NUNES; MARTINS, 2002).

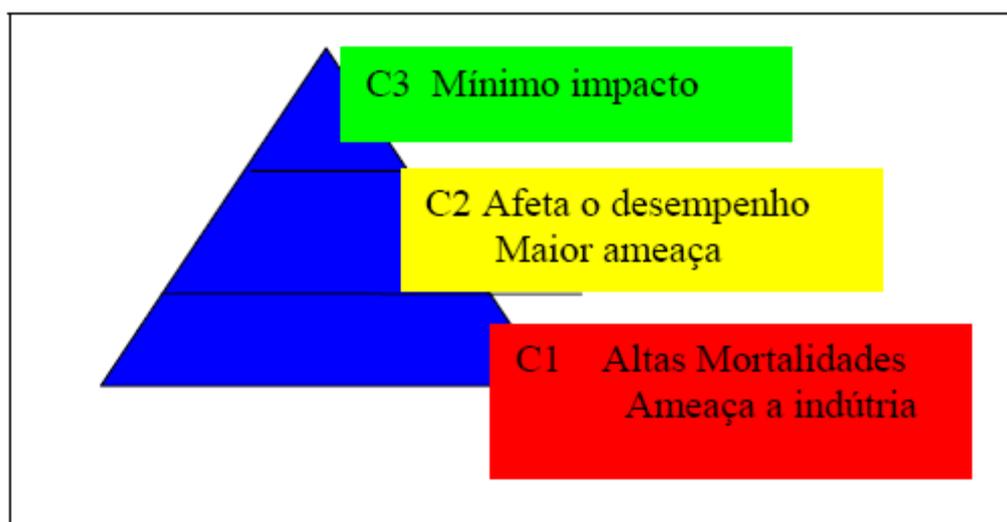


Figura 6. Níveis de patogenicidade na aqüicultura.
Fonte: NUNES; MARTINS (2002).

Uma forma de garantir condições ambientais ideais durante o cultivo está intimamente relacionada com a qualidade da água. É devido a esta relação que seus parâmetros devem ser rotineiramente monitorados. Segundo Fonseca; Rocha (2004), a manutenção dos níveis ideais da qualidade da água é de extrema importância para evitar o aparecimento de doenças nos animais em cultivo. Sendo é um fator determinante para a sobrevivência e crescimento dos camarões cultivados. O principal propósito em se manejar a qualidade da água de qualquer sistema de cultivo é regular e manter ótimas condições para o crescimento dos organismos. Mais que qualquer outro fator, os parâmetros hidrológicos influenciam em todas as atividades dos organismos (alimentação, respiração, reprodução, crescimento e estado imunológico) (VILLALÓN, 1991).

A utilização de procedimentos para diagnosticar o estado de saúde de camarões cultivados serve para detectar precocemente problemas no sistema de cultivo, como a presença de enfermidades, condições ambientais adversas ou ainda deficiências nutricionais e/ou genéticas da população. Isto permite que ações sejam tomadas rapidamente para controlar, minimizar ou excluir os efeitos negativos de condições desfavoráveis sobre a produção de camarão, reduzindo os prejuízos financeiros resultantes da perda ou mau desempenho do estoque cultivado (BARROSO, 2005). Para se obter êxito em um controle sanitário é necessário o prévio conhecimento do estado de saúde dos animais na área de cultivo, baseado em inspeções e padronização de procedimentos de amostragem, seguidas de diagnóstico laboratorial, de acordo com as normas internacionais (MACIEL et al., 2003).

O estresse é referido pelos epidemiologistas como sendo fator iniciante ou predisponente ao surgimento de doenças em animais cultivados (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Especificamente na carcinicultura, o estresse tem sido citado com frequência como fator predisponente, relacionado ao desequilíbrio do meio ambiente, a uma maior vulnerabilidade dos espécimes, culminando em debilidade, manifestação de doenças e, conforme a severidade destas, chegando à morte (LIGHTNER, 1997).

Segundo Machado (1988), a rápida, porém pouco planejada expansão de fazendas de camarão criou problemas ambientais, a exemplo do Equador, onde mais de 2.500 hectares de áreas de mangue foram destruídas para construção de viveiros o que afetou seriamente os ecossistemas estuarinos. Tanto no Equador, Taiwan, Indonésia, como em outros, surtos de epidemias associados à degradação ambiental resultaram em acentuada diminuição da

produção, chegando, em alguns casos, ao fechamento de fazendas nas décadas de 80 e 90 do século passado (LENOCH, 2004).

Dentre os prejuízos sofridos pelo ambiente e que afetam diretamente a carcinicultura os principais são: a poluição das águas subterrâneas e superficiais por meio da produção de chorume e da acumulação dos resíduos, a contaminação dos solos com metais pesados e microrganismos patogênicos e até mesmo a degradação visual das paisagens (DIAS, 1999).

A cultura de camarão sofre problemas relacionados com questões ambientais devido ao seu rápido desenvolvimento e altas taxas de estocagem, resultando no surgimento de estresse nos animais e, subseqüentemente, a incidência de doenças. Muitas fazendas de camarão foram afetadas por epidemias de vírus e vibrioses (CHIU et al., 2007).

2.6 *Vibrio*

2.6.1 Características principais

Os vibrios são bastonetes Gram-negativos, geralmente móveis, mesófilos e anaeróbicos facultativos. Em geral, suas células podem chegar a medir 1 μm de largura e entre 2 e 3 μm de comprimento; quando móveis possuem no mínimo, um flagelo polar. Em sua maioria são oxidase-positiva (FARMER; HICKMAN-BRENNER, 1992). As colônias são tipicamente lisas, convexas, de consistência cremosa, branco-acinzentadas, com bordas contínuas. Em certas ocasiões, são observadas colônias rugosas, aderentes ao ágar. Certos vibrios marinhos podem invadir a superfície do meio sólido, propriedade associada à presença de células longas com flagelos laterais. Têm

capacidade de realizar metabolismo tanto oxidativo quanto fermentativo e são produtores de citocromo oxidase (KONEMAN et al., 2001).

2.6.2 *Vibrio* na carcinicultura

O cultivo de camarões marinhos tem, cada vez mais, se tornado vulnerável a enfermidades causadas por agentes patogênicos como: bactérias, protozoários, fungos e vírus, em virtude da fácil transmissão destes nos locais de cultivos (BOAVENTURA; CANUTO; FERREIRA, 2006). Algumas bactérias são comumente encontradas nos camarões e fazem parte do ambiente marinho ou estuarino. Contudo, as modificações das condições naturais do meio, dos organismos cultivados, o aumento da matéria orgânica no ambiente aquático resultante de restos de alimentos, dejetos e animais mortos, podem desequilibrar a comunidade bacteriana, estimulando assim o crescimento de patógenos oportunistas nos ambientes de cultivo, como é o caso de algumas espécies do gênero *Vibrio* (GUZMÁN; VALLE, 2000).

As bactérias podem constituir em ameaças para os sistemas de larvicultura e engorda de camarões, e as espécies do gênero *Vibrio* são consideradas as principais responsáveis por um grande número de doenças, podendo causar mortalidade de até 100% dos indivíduos (BROCK; LEAMASTER, 1992). Epizootias causadas por agentes infecciosos têm provocado graves perdas na carcinicultura mundial. Enfermidades bacterianas e virais são as mais comuns, embora as viroses sejam responsáveis pela maioria dos danos econômicos (GESTEIRA, 2006).

As doenças causadas por bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* são reconhecidas de várias formas e algumas delas são: enfermidade bacteriana, enterite séptica hemocítica, síndrome das bolitas, septicemia bacteriana dos

peneídeos, vibrioses dos peneídeos, vibriose luminescente, enfermidade das patas vermelhas; e os sintomas mais freqüentes são: intestino semi-vazio, anorexia, inflamação de alguns órgãos internos (órgão linfóide, coração, hepatopâncreas etc). Pode-se observar, através de microscopia, um grande número de bactérias presentes na hemolinfa durante uma septicemia (KARUNASAGAR et al., 1994). A presença de víbrios na hemolinfa é um fator preocupante, pois a doença já pode estar generalizada, uma vez que a hemolinfa deve ser, se não estéril, pelo menos, pouco contaminada (LIGHTNER, 1977). Quando ocorre a invasão da hemolinfa por bactérias, a saúde dos animais já está comprometida (GOMEZ-GIL et. al., 1998).

Os surtos de vibrioses são geralmente causados por desequilíbrio na população das bactérias do gênero *Vibrio* que se encontra, naturalmente, nos ecossistemas estuarino e marinho. Entre as principais espécies do gênero que causam maiores prejuízos estão o *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. penaeicida* e *V. fluvialis*. (RAMIREZ-TORO, 2005).

As vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, atacando todos os estágios de vida do camarão (larval, pós-larval, juvenil e adulta). Problemas com vibriose ocorrem quando condições de estresse surgem no sistema de cultivo, tais como: (a) queda de oxigênio; (b) densidade de estocagem excessiva (super povoamento); (c) manuseio inadequado do estoque (e.g., transferência); (d) lesões na cutícula dos camarões; (e) subalimentação; e (f) altas concentrações de compostos nitrogenados no ambiente de cultivo. O processo de infecção da vibriose pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos

pontuais no hepatopâncreas. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem sofrer canibalismo, rapidamente contaminando outros indivíduos na população (NUNES; MARTINS, 2002).

Portanto, a enfermidade é resultante de uma resposta pouco eficiente do animal a agentes lesivos. Segundo Jones, Hunt, King (2000), a maioria das respostas consiste em mecanismos de defesa visando neutralizar ou eliminar o agente lesivo. Se a resposta não é bem sucedida, instala-se a doença. Para Thrusfield (2004), o estresse abrange uma grande variedade de respostas do animal a estímulos ou mudanças ambientais. Segundo o mesmo autor, apesar de não existir uma teoria geral do estresse, aceita unanimemente, nem tampouco uma definição exata do papel da imunossupressão na predisposição dos animais a doenças infecciosas, há evidências a partir de estudos epidemiológicos, de sua relevância funcional.

2.6.3 Principais vibrios no camarão

Os vibrios ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e é fácil observar sua presença durante o cultivo de camarão (VANDENBERGHE, et al., 1998). Durante as últimas décadas foram reconhecidas novas espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*. Segundo Thompson et al.,(2004) , esse número estaria em 63 espécies; mas de acordo com a DSMZ (2009), atualmente, o gênero possui 86 espécies. As principais espécies de vibrios patogênicas ao camarão são:

a) *Vibrio harveyi*

É um microrganismo Gram-negativo que pode ser encontrado em diversos ambientes marinhos, crescendo bem em meios contendo cloreto de sódio. Essa espécie já foi classificada como *Achromobacter harveyi*,

Lucibacterium harveyi e *Beneckeia harveyi*, mas é *Vibrio harveyi* (FARMER et al., 2005). Essa espécie de *Vibrio* possui importância considerável, pois traz sérios problemas tanto na piscicultura como na carcinicultura. Nos camarões em particular, esse patógeno está associado a vibrioses luminescentes e a síndrome das bolitas (AUSTIN; ZHANG, 2006).

b) *Vibrio parahaemolyticus*

Importante espécie do gênero *Vibrio* foi isolado pela primeira vez em 1951 no Japão, a partir de um surto de gastroenterite ocasionado pela ingestão de *shirasu* (sardinhas novas, semi-dessecadas) não submetidas à cocção (RIPPEY, 1994). Sua distribuição no ambiente marinho está relacionada com a temperatura da água, tendo sido detectado na água do mar com temperatura na faixa de 15°C (KANEKO; COLWELL, 1973).

Na carcinicultura, *V. parahaemolyticus* está associado a patologias nas fases larval, juvenil e adulta (CHANRATCHAKOOL et al., 1995), sendo ainda mais patogênico no estágio larval (LIGHTNER, 1993). Em humanos, esse microrganismo pode causar vários tipos de infecções, tais 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).

c) *Vibrio alginolyticus*

Foi originalmente classificado como biotipo 2 de *V. parahaemolyticus*. A maioria dos isolados clínicos é proveniente de feridas superficiais ou do ouvido externo. Também foram registrados casos de gastroenterite aguda e bacteremia

produzidas pelo microrganismo (KONEMAN et al., 2001). É um importante patógeno de animais aquáticos e de seres humanos (XIE et al., 2005). A espécie tem chamado a atenção de pesquisadores devido ao aumento das patologias entéricas, casos de otite e infecções cutâneas relacionados com o consumo de pescado e com a exposição à água (GOMEZ et al., 2003). É um patógeno oportunista sendo responsável por infecções secundárias em camarões *Litopenaeus vannamei* (LIU et al., 2004).

d) *Vibrio mimicus*

É uma bactéria Gram negativa e bioquimicamente similar ao *Vibrio cholerae*. A diferença entre as duas espécies está relacionada com a resposta à fermentação da sacarose e ao teste de Voges-Proskauer. Em ambos os casos há uma resposta negativa (DAVIS et al., 1981). Os sintomas ocasionados ao homem pela infecção causada por esse microrganismo são: febre, náuseas, vômitos e dores abdominais, os quais são provavelmente devido a muitos tipos de fatores de virulência produzidos pelo *V. mimicus* (SHANDERA et al., 1983). É um patógeno que produz uma grande quantidade de toxinas, tais como as fosfolipases, hemolisinas, toxina cólera (CT), hemaglutinina e proteases (LEE et al., 1998).

e) *Vibrio diabolicus*

Foi descrito pela primeira vez através de isolados oriundos de fontes hidrotermais do alto mar. São bastonetes Gram-negativos, móveis por um único flagelo polar em meio líquido. Não luminescentes e facultativamente anaeróbios. São capazes de metabolismo fermentativo e respiratório. São positivos para catalase, oxidase e quitinase. Reduzem nitrato a nitrito. Crescem

a temperaturas de 20 °C a 45°C, mas não crescem a 4°C e esse teste consta da chave de identificação de Nogueroles; Blanch (2008). (RAGUÉNÈS et al., 1997).

f) *Vibrio coralliilyticus*

São bastonetes Gram-negativas não formadores de esporos, móveis por um único flagelo polar. Formam colônias amarelas em ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) após incubação de 18 h a 30°C. São halofílicas e necessitam de NaCl para seu crescimento, com ótimo entre 1 e 7% de NaCl. Os testes para catalase e oxidase são positivos, reduzem nitrato a nitrito. São susceptíveis ao agente vibriostático O/129, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e gentamicina. Resistentes a kanamicina. Foram isoladas de corais doentes da espécie *Pollicopora damicornis* no Oceano Índico (BEM-HAIM; ZICHERMAN-KEREM; ROSENBERG, 2003).

g) *Vibrio fluvialis*

Foi inicialmente descrito por Lee; Donovan; Furniss, (1978), e sua associação com doenças humanas foi confirmada após seu isolamento em pacientes com diarreia em Bangladesh. Este *Vibrio* é um patógeno freqüentemente halofílico encontrado em ambientes marinhos e também em pescados. Atualmente *V. fluvialis* é conhecido por causar infecções graves, pois seus sintomas clínicos são muito semelhantes aos causados pelo *V. cholerae*. Isso se tornou ainda mais grave após a recente caracterização de uma enterotoxina semelhante a hemolisina El Tor, o que representa um fator de virulência (KOTHARY et al., 2003).

h) *Vibrio vulnificus*

É uma bactéria Gram-negativa e uma espécie moderadamente halofílica. São víbrios encontrados em áreas tropicais e em águas salobras. São bastonetes curvos e quando móveis possuem um único flagelo polar. A espécie também apresenta diversos estilos de vida, livres no ambiente e associadas a parasitas de animais, tais como: moluscos, peixes, crustáceos e mamíferos, incluindo seres humanos (VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003). Na carcinicultura, os camarões infectados por esse patógeno perdem a qualidade, e o preço é reduzido devido à aparência física como o surgimento de manchas pretas (RENGPIPAT; PUSIRIRIT; RUKPRATANPORN, 2008). Em humanos o consumo de pescado contaminado ou a exposição de feridas em água contaminada pode levar à infecção sistêmica e à infecção da pele com elevada taxa de mortalidade (STARKS et al., 2000).

i) *Vibrio metschnikovii*

Taxonomicamente *Vibrio metschnikovii* era conhecido com *Beneckea*, mas posteriormente foi classificado como uma nova espécie de *Vibrio* (LEE; DONOVAN; FURNISS, 1978). Essa espécie de *Vibrio* se diferencia das outras espécies de *Vibrio* devido a sua incapacidade em produzir citocromo oxidase e na redução de nitrato (WEST; COLWELL, 1983). *Vibrio metschnikovii* é um habitante natural do ambiente aquático e tem sido isolado de pescados (MATTÉ et al., 2007). Raramente, essa bactéria tem sido relacionada com doença em humanos, acometendo habitualmente pacientes imunodeprimidos.

j) *Vibrio cholerae*

É um anaeróbico facultativo, Gram-negativo e não formador de esporos. No entanto, uma diferença importante de outros víbrios é a capacidade que ele apresenta de crescer em caldo nutriente sem adição de NaCl (BAUMANN; FURNISS; LEE, 1984). *V. cholerae*, agente etiológico do cólera, é a espécie mais conhecida do gênero. Os membros da espécie são divididos com base nos sorogrupos descritos até hoje. *V. cholerae* O1 e O139 são responsáveis por causar o cólera do tipo clássico, que pode ocorrer em epidemias ou pandemias mundiais (MURRAY et al., 2004). É o agente etiológico do cólera epidêmica e pandêmica humanas. Dentro da espécie, existe uma grande diferença entre as cepas, tanto no que se refere ao potencial patogênico como ao epidemiológico (KONEMAN et al., 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta

As coletas foram realizadas durante o período chuvoso e de estiagem em quatro fazendas do Estado no Ceará, duas localizadas no estuário do Rio Acaraú, e duas no Rio Jaguaribe (Figura 8) no período de março a dezembro de 2008.

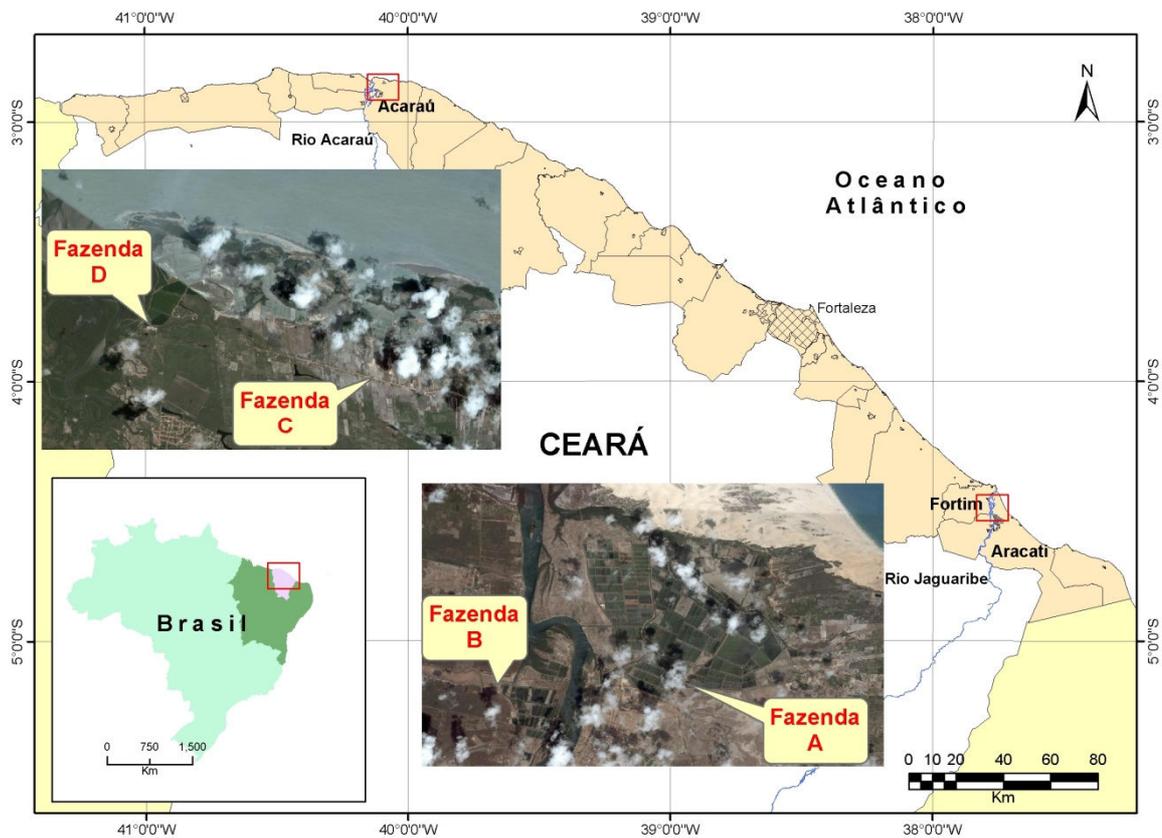


Figura 7. Localização das fazendas situadas no estuário do Rio Acaraú e no estuário do Rio Jaguaribe.

Foram realizadas dezesseis coletas nas quatro fazendas (períodos de chuva e de estiagem), oito com camarões 4 g (trinta dias de cultivo). O mesmo procedimento foi realizado quando os camarões alcançaram 8 g (noventa dias de cultivo). No final, foram analisados 30 exemplares de camarão de cada fazenda em cada coleta, totalizando 480 camarões amostrados.

As coletas foram realizadas de acordo com o peso dos camarões. Os camarões foram capturados com ajuda de uma rede e acondicionados em uma caixa isotérmica com água do próprio cultivo quando então eram transportados até o laboratório da fazenda para extração da hemolinfa.

3.2 Processamento das amostras

3.2.1 Teste de coagulação da hemolinfa

Na fazenda, cada exemplar de camarão recebia um código numérico (1 a 30). A parte ventral dos camarões era desinfetada com álcool a 70% antes das análises.

Foi utilizada uma agulha para perfurar a parte dorsal do camarão, localizada próximo ao cefalotórax, objetivando atingir o seio sanguíneo. A partir desse procedimento, os animais eram inclinados sobre uma lâmina, para obtenção de, aproximadamente, duas gotas de hemolinfa. Fazia-se um esfregão desse material sobre a lâmina com o auxílio da agulha e, simultaneamente, se observava o tempo de coagulação (Figura 8).



Figura 8. Teste de coagulação da hemolinfa

3.2.2 Extração da hemolinfa

Os camarões foram mantidos em gelo, o que os deixava em estado letárgico, facilitando a coleta da hemolinfa. A coleta da hemolinfa foi realizada por punção ventral direta, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal (Figura 9), utilizando-se para isso uma seringa com agulha hipodérmica de 30 x 8 mm, contendo citrato de sódio 10% como anticoagulante conforme descrito por Lightner (1996). A proporção anticoagulante/ hemolinfa foi de 1:6. Cada amostra de hemolinfa, correspondente a um indivíduo, foi armazenada em tubos *Eppendorf* e mantida em gelo até a chegada ao laboratório, para o procedimento das análises.



Figura 9. Extração da hemolinfa.

3.3 Contagem e isolamento de *Vibrio* spp

3.3.1 Semeadura das amostras

A partir das amostras de hemolinfa foram realizadas diluições seriadas em salina 1% de NaCl (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). De cada diluição foram tomadas alíquotas de 0,1mL que foram semeadas pela técnica de “spread plate”, em duplicata, sobre superfície do meio Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 18 horas (ELLIOT et al., 1995), de acordo com a figura 10.

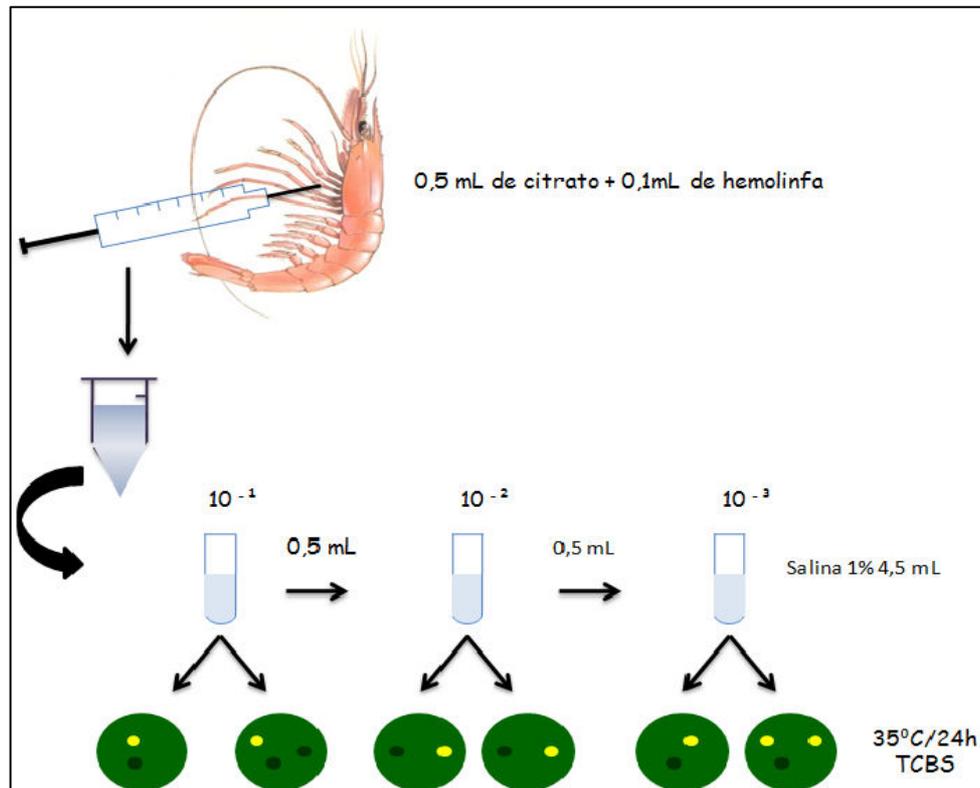


Figura 10. Fluxograma da análise da hemolinfa

3.3.2 Contagem e isolamento de *Vibrio* spp

A contagem das colônias foi realizada com um contador de colônias marca Phoenix modelo EC 550^a, quando foram contadas as colônias suspeitas de *Vibrio* spp., observando-se o intervalo de 25 a 250 colônias em cada placa (DOWNES; ITO, 2001). O cálculo da UFC/mL era realizado da seguinte forma:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{inverso da diluição} \times 10$$

Quando não ocorria crescimento no intervalo de 25 a 250 colônias, o resultado era expresso como UFC / mL / estimada.

3.4 Identificação morfológica e bioquímica das espécies de *Vibrio* spp.

As colônias que apresentavam características de *Vibrio*, sacarose negativa e/ou positiva crescidas em ágar TCBS, eram isoladas em ágar triptona soja (TSA) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 horas. As colônias puras foram submetidas à coloração de Gram, ao teste de motilidade, e às provas bioquímicas de 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. (1995) sendo complementadas através da chave de identificação segundo Alsina; Blanch (1994) e Noguerola; Blanch (2008).

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 a coloração de Gram de acordo com Soares, Cassimiro, Albuquerque (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 apresentassem 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 está de acordo com o Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (DOWNES; ITO, 2001; VIEIRA 2000; KAYSNER, 2000; ALSINA; BLANCH 1994; NOGUEROLA; BLANCH, 2008).

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-pfenilendiamina a 1% (recém preparada). O teste foi considerado positivo quando do aparecimento de uma coloração azul arroxeadado em 10 segundos. Essa prova é considerada positiva para os todos os membros da família Vibrionaceae, com exceção do *V. metschnikovii*.

3.4.3.2 Produção de indol

Do crescimento das estirpes no meio de TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com agulha de níquel-cromo e semeada em ágar SIM com 1% de NaCl. Procedeu-se a incubação em estufa a 35°C por 48 horas. Transcorrido o período de incubação, foi adicionado à cultura 1 mL 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.

3.4.3.3 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, a quantidade de 5 mL para arginina, lisina e ornitina. Paralelamente, cada cultura foi inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer aminoácido (controle). Após a inoculação em cada tubo foi adicionado 1 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.

3.4.3.4 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 de púrpura para amarelo, o que indica prova positiva.

3.4.3.5 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 0,25 mL 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°C 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.

3.4.3.6 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 cinco 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 e observados após o período de incubação. Os resultados foram considerados positivos quando constatou-se crescimento da cultura (turvação do meio).

3.4.3.7 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 0,6 mL de Barrit I (solução de alfa-naftol a 5%) e 0,2 mL de Barrit II (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.

3.5 Testes adicionais

3.5.1 Teste de redução do nitrato

A partir do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com alça de níquel-cromo e semeadas em tubos contendo caldo nitrato. Para culturas de bactérias não fermentadoras, o gás N₂, pode ser detectado colocando-se um tubo de Durham no tubo de caldo nitrato, e incubado a 35°C por 1-5 dias. Havendo presença de gás, o resultado é considerado positivo para a denitrificação. Não havendo produção de gás ou se o organismo for fermentador, adicionam-se diretamente à cultura, 5 gotas da solução 0,6% de N,N,dimetil- α -naftilamina e 5 gotas da solução 0,8% de ácido sulfanílico. Agita-se delicadamente os tubos e observa-se o resultado. O desenvolvimento de uma cor vermelha no intervalo de 1 a 2 minutos indica teste positivo. Se não houver o desenvolvimento da cor (nitrito ausente), deve-se passar à última etapa do teste, que consiste em adicionar 20 mg de zinco aos tubos. O desenvolvimento de uma cor vermelha é indicativo da positividade do teste.

3.5.2 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 por 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.

3.5.3 Crescimento a 4°C, 35°C e 40°C

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% de NaCl. Os tubos foram incubados a 4°C, 35°C e 40°C por 24 horas e observados após o período de incubação. Os resultados foram considerados positivos quando houve crescimento observado pela turvação do meio.

3.5.4 Resistência a ampicilina 10µg

As cepas que apresentavam características de *Vibrio* foram isoladas em TSA contendo 1% de NaCl, sendo então inoculadas em tubos contendo solução salina a 0,85% de modo a se obter uma turvação equivalente à turbidez do tubo 0,5 na escala de McFarland. A absorvância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal B542) variando entre 0,08 e 0,10, utilizando um comprimento de onda de 625 nm, turbidez óptica comparável à solução padrão de McFarland. Das soluções ajustadas, foram retirados inóculos com emprego de “swab” e semeados no meio de Mueller-Hinton com 1% de NaCl. Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com a técnica da difusão em ágar conforme detalhamento em CLSI (2007), sendo testados os discos (labiclin) impregnados com ampicilina (AMP) 10 µg.

3.5.5 Resistência ao O/129 10µg

As cepas características de *Vibrio* e isoladas em TSA contendo 1% de NaCl foram inoculadas em tubos contendo solução salina a 0,85% de modo a se obter uma turvação equivalente à turbidez do tubo 0,5 na escala de McFarland. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro (Micronal B542), variando entre 0,08 e 0,10, utilizando um comprimento de onda de 625 nm. Das soluções ajustadas, foram retirados inóculos com emprego de “swab” e semeados em placas contendo meio de Mueller-Hinton com 1% de NaCl. Em seguida colocou-se o disco do agente vibriostático O129/10µg e incubou-se a 35°C por 24h. A positividade do teste foi observada através da presença de uma zona de inibição ao redor do disco.

4. TESTES ESTATÍSTICOS

A técnica estatística escolhida para se realizar os testes comparativos foi o Coeficiente de Correlação de Pearson (VIEIRA, 2003). Com o objetivo de verificar a relação entre o tempo de coagulação da hemolinfa e a contagem de *Vibrio* total, *Vibrio* SAC + e *Vibrio* SAC-, separadamente, para camarões com 4 g (chuvoso e estio) e com 8 g.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O intervalo do tempo de coagulação dos indivíduos com 4 g e com 8 g, tanto no período chuvoso, como no período de estio apresentou os seguintes resultados: fazenda A, 6" a 42" e 2" a 28"; fazenda B, 5" a 25" e 4" a 17", fazenda C, 5" a 15" e 6" a 28" e na fazenda D, 3" a 10" e 5" a 15".

Segundo Barraco; Perazzolo; Rosa (2004), a coagulação da hemolinfa rápida e eficiente é uma garantia para os animais aquáticos de circulação aberta como a dos crustáceos porque garante a rápida vedação dos ferimentos, evitando a perda da hemolinfa e impedindo a entrada de microrganismos provenientes do ambiente aquático.

A hemolinfa de camarões infectados por bactérias coagula lentamente, necessitando de mais de um minuto em temperatura de 20 – 30°C, enquanto, a hemolinfa de um animal sadio coagula em menos de um minuto. Há, entretanto, discordância entre muitos autores com relação ao tempo de coagulação da hemolinfa, alguns citando como aceitável apenas 20 segundos. Durante uma infecção, o número de hemócitos pode reduzir drasticamente devido ao seu envolvimento no sistema de defesa. O camarão quando infectado pode apresentar sintomas tais como: natação errática, períodos de desorientação e alterados com períodos de letargia, em casos mais graves (SANTOS et al., 2005). O monitoramento do 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; LOY; REDDINGTON; 2004).

É interessante salientar que a hematologia e a bioquímica clínica, duas ferramentas em medicina humana e veterinária, sejam ainda tão raramente empregadas como instrumento de diagnóstico em patologias de crustáceos. Somente o tempo de coagulação e os hemogramas têm sido utilizados no diagnóstico de enfermidades em camarões cultivados (LIGHTNER, 1996). Na carcinicultura, essas ferramentas como indicadores da saúde vêm sendo comumente utilizadas, apesar da grande variabilidade em seus valores de referência, mesmo dentro de uma mesma população, sexo e estágio de desenvolvimento. Os parâmetros hemato-imunológicos mais comumente empregados em crustáceos são: (1) hemogramas (contagem total e diferencial de hemócitos), (2) coagulação da hemolinfa, (3) atividade da enzima PO, (4) índice fagocítico, (5) produção de ROIs, (6) atividade antimicrobiana, (7) título hemaglutinante do plasma e (8) concentração de proteínas totais da hemolinfa. Outros parâmetros, contudo, começam a ser implementados, como a atividade da lisozima hemolinfática, produção de RNIs e atividade do inibidor de protease α 2M (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA; 2007).

Os resultados das contagens padrão em placas (CPP) das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Vibrio* nas amostras de hemolinfa dos camarões no período chuvoso encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2. Foi observada uma variação de $2,13 \times 10^4$ a $28,70 \times 10^6$ UFC/mL est. de *Vibrio* total em todas as contagens. Quando foram contadas separadamente as colônias sacarose negativas e positivas, os valores obtidos para os camarões com peso médio de 4 g foram: $< 6,0$ a $14,64 \times 10^6$ UFC/mL (SAC-) e $< 6,0$ a $12,72 \times 10^6$ UFC/mL (SAC+). Na hemolinfa dos camarões com 8g a variação foi de $< 6,0$ a $1,8 \times 10^5$ UFC/mL (SAC-) e de $< 6,0$ a $15,18 \times 10^6$ UFC/mL est.

(SAC+). Do número total de camarões analisados (240) no período chuvoso, 20% (4 g) e 3,33% (8 g) apresentaram víbrios em suas hemolinhas.

Tabela 1. Contagens padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log10) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em unidade formadora de colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinha de camarão com o peso de 4 g, no período chuvoso.

Contagem em Hemolinha de camarão com 4g (UFC/mL)								
Fazendas	<i>Vibrio</i> spp.		Colônias Sacarose -			Colônias Sacarose +		
	Total	log total	MIN	MAX	log	MIN	MAX	log
A	$8,73 \times 10^6$	6,94	< 6,0	$7,68 \times 10^6$	5,86	< 6,0	$10,5 \times 10^5$	6,02
B	$1,05 \times 10^7$	7,02	< 6,0	$2,7 \times 10^4$	4,43	< 6,0	$10,5 \times 10^5$	6,02
C	$2,87 \times 10^7$ est	7,46	< 6,0	$14,64 \times 10^6$	7,16	< 6,0	$12,72 \times 10^6$	7,1
D	$1,74 \times 10^6$	6,24	< 6,0	$1,74 \times 10^6$	6,24	< 6,0	$4,95 \times 10^5$	5,69

est. - estimado

Tabela 2. Contagens padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log10) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em unidade formadora de colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinha de camarão com o peso de 8 g, no período chuvoso.

Contagem em hemolinha de camarão com 8 g (UFC/mL)								
Fazendas	<i>Vibrio</i> spp.		Colônias Sacarose -			Colônias Sacarose +		
	Total	log total	MIN	MAX	log	MIN	MAX	log
A	$2,13 \times 10^4$	4,33	< 6,0	$4,5 \times 10^3$	3,65	< 6,0	$1,68 \times 10^4$	4,23
B	$4,59 \times 10^6$	6,66	< 6,0	$1,8 \times 10^5$	5,25	< 6,0	$4,47 \times 10^6$	6,65
C	$15,18 \times 10^6$ est	7,18	< 6,0	< 6,0	0,78	< 6,0	$15,18 \times 10^6$ est	7,18
D	$2,13 \times 10^4$	4,33	< 6,0	$4,5 \times 10^3$	3,65	< 6,0	$1,68 \times 10^4$	4,23

est. - estimado

No período de chuvoso as fazendas A, B e D a CPP de *Vibrio* e de *Vibrio* (SAC-) na hemolinha dos camarões com 4 g foram maiores do que os observados na hemolinha dos camarões de 8 g. Este comportamento não foi confirmado pra fazenda C, pois os valores de *Vibrio* total e de *Vibrio* (SAC+) foram maiores nos camarões com 8 g em relação aos de 4 g.

Vieira (2008) pesquisando a relação do tempo de coagulação com a quantidade de *Vibrio* em hemolinha de camarões cultivados em três fazendas

do Estado do Ceará, durante o período chuvoso, obteve valores de CPP de *Vibrio* variando de 10 a 2×10^3 UFC/mL, sendo esses valores inferiores aos encontrados na presente pesquisa.

Em contrapartida, Silva (2007) encontrou uma variação no número de vibrios totais entre $1,0 \times 10$ e $1,1 \times 10^5$ UFC/mL na hemolinfa de camarões cultivados em Pernambuco. Os valores encontrados pelo autor corroboram com os dados observados na pesquisa.

No período de estio, as CPPs de *Vibrio* na hemolinfa das amostras das quatro fazendas variaram de $9,0 \times 10^2$ UFC/mL est. a $2,0 \times 10^7$ UFC/mL. Ao separar as colônias sacarose negativas das positivas, os valores obtidos para os camarões com 4 g variaram de $< 6,0$ a $1,71 \times 10^4$ UFC/mL (SAC-) e $< 6,0$ a $5,40 \times 10^4$ UFC/mL (SAC+). As contagens de vibrios para os camarões com 8 g variaram de $< 6,0$ a $4,02 \times 10^6$ UFC/mL (SAC-) e $< 6,0$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/mL est. (Tabelas 3 e 4). Do total de camarões analisados (240), no período de estio, 7,90% (4 g) e 18,33% (8 g) apresentaram vibrios em suas hemolinfas.

Tabela 3. Contagens padrão em placas (CPP) de total e logaritimizada (log10) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em unidade formadora de colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinfa de camarão com o peso de 4 g, no período de estio.

Contagem em hemolinfa de camarão com 4 g (UFC/mL)								
Fazendas	<i>Vibrio</i> spp.		Colônias Sacarose -			Colônias Sacarose +		
	Total	log total	MIN	MAX	log	MIN	MAX	log
A	$1,71 \times 10^4$	4,23	$< 6,0$	$1,71 \times 10^4$	4,23	$< 6,0$	$1,8 \times 10^3$	3,35
B	$9,0 \times 10^2$ est	2,95	$< 6,0$	$9,0 \times 10^2$ est	2,95	$< 6,0$	$< 6,0$	0,78
C	$5,40 \times 10^4$	4,73	$< 6,0$	$6,0 \times 10^2$ est	2,78	$< 6,0$	$5,40 \times 10^4$	4,73
D	$8,7 \times 10^3$	3,94	$< 6,0$	$< 6,0$	0,78	$< 6,0$	$8,7 \times 10^3$	3,94

est. - estimado

Tabela 4. Contagens Padrão em placas (CPP) total e logaritimizada (log10) e valores máximos e mínimos e de colônias sacarose negativas e positivas, expressa em Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL) de *Vibrio*, em amostras de hemolinfa de camarão com o peso de 8g, no período de estio.

Contagem de <i>Vibrio</i> spp. Hemolinfa de camarão com 8g (UFC/mL)								
Fazendas	<i>Vibrio</i> spp.		Colônias Sacarose -			Colônias Sacarose +		
	Total	log total	MIN	MAX	log	MIN	MAX	log
A	9,0 x 10 ² est	2,95	< 6,0	6,0 x 10 ² est	2,78	< 6,0	3,0 x 10 ² est	2,47
B	x	x	x	x	x	x	x	x
C	1,80 x 10 ⁷	7,25	< 6,0	4,02 x 10 ⁶	6,6	< 6,0	1,80 x 10 ⁷	7,25
D	2,0 x 10 ⁷ est	7,32	< 6,0	4,3 x 10 ³ est	3,62	< 6,0	2,0 x 10 ⁷ est	7,32

x – despescado antes da amostragem
est. – estimado

A fazenda A apresentou valores elevados para vibrios totais, *Vibrio* (SAC-) e *Vibrio* (SAC+) na hemolinfa dos camarões com 4 g quando comparados aos de 8 g. Já nas fazendas C e D as CPPs de vibrios totais e de *Vibrio* (SAC+) dos camarões com 4 g foram menores do que as dos camarões com 8g. As CPP de *Vibrio* (SAC-) na hemolinfa dos camarões de 4 g da Fazenda D foram tão baixas que na menor diluição não foram detectáveis, o mesmo fato se repetiu para os valores mínimos apresentados pelos camarões de 8 g da mesma fazenda. Mesmo os valores máximos de CPP de *Vibrio* SAC- e SAC+ para as hemolinfas dos camarões de 8 g dessa fazenda foram apresentados em contagens estimadas, o que minimiza sua importância.

Gomez-Gil et al. (1998), quantificando *Vibrio* spp. na hemolinfa do camarão *Penaeus. vannamei*, encontraram valores variando de 3 x 10³ a 1,60 x 10³, UFC/mL. Os índices encontrados pelos autores são semelhantes aos resultados obtidos na presente pesquisa, ficando mais evidenciados para as contagens de vibrios observados nas fazendas B e D no período chuvoso e para fazenda A no estio.

Na pesquisa realizada por Gopal et al. (2005) enumerando a CPP de *Vibrio* em amostras de hemolinfa do camarão cultivado na costa leste e oeste da Índia, os índices obtidos variaram entre $1,52 \times 10^3$ e $4,36 \times 10^4$ UFC/mL, valores semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Em contrapartida, Vieira (2008) pesquisando a relação do tempo de coagulação com a quantidade de *Vibrio* em hemolinfa de camarões cultivados em três fazendas do Estado do Ceará na estação seca obteve os seguintes resultados: 1×10^3 a $2,8 \times 10^4$ UFC/mL, com o tempo de coagulação variando entre 16" a 55". Apesar de terem sido coletados no período de estio, os índices discordam dos nossos achados.

De acordo com Santos et al. (2005), uma biomassa bacteriana menor que 300 UFC/mL na hemolinfa do camarão é considerada normal. Nos dois períodos, 75% dos exemplares do crustáceo apresentaram valores de *Vibrio* bem mais elevados discordando da afirmação do autor.

Tanto no período chuvoso como no estio, não houve detecção de víbrios, ou a quantidade era tão pequena que o método não detectou, em 25% das hemolinfas dos camarões analisados (Tabelas 1, 2, 3, e 4) .

A análise estatística demonstrou que não há relação entre o tempo de coagulação da hemolinfa e a contagem de *Vibrio* total, *Vibrio* SAC + e *Vibrio* SAC-; provando assim que esse parâmetro para se detectar a presença de epizootias em camarões é duvidoso.

De acordo com Dantas (2008), a determinação da carga de víbrios não deve ser dissociada da anamnese dos animais, o que permite concluir um diagnóstico preciso. Entretanto, Lightner (1977) afirma que a detecção da bactéria na hemolinfa já possibilita um diagnóstico sugestivo de septicemia.

Segundo SUNG et al. (1999), o aumento no número de *Vibrio* em camarões está associado a uma significativa mudança na comunidade desse gênero na água dos viveiros, o que *per si* possibilitaria o desencadeamento de vibrioses.

Durante o período da pesquisa não foram registrados elevados índices de mortalidades nas fazendas estudadas. As taxas de sobrevivência no período chuvoso foram: 73,7% para fazenda A; 91,8% para fazenda B e 95% para fazenda C. A fazenda D não disponibilizou o dado, nem para o período chuvoso e nem para o de estio. Pesquisadores do Centro de Diagnósticos de Enfermidades de Camarão Marinho (CEDECAM) – LABOMAR – UFC, depois de analisar histopatologicamente camarões da mesma origem, coletados no período chuvoso, constataram vibrioses ao encontrarem lesões nos túbulos do hepatopâncreas e nas brânquias em 40% das amostras dos camarões da fazenda A; em 58% da fazenda B; e em 87% para os das fazenda C. As análises das amostras coletadas na fazenda D não foram liberadas até o momento. Os dados sugerem que o agente causador das alterações teciduais possa ser bactérias do gênero *Vibrio*. Os valores relacionados com o período de estio não foram tabulados pelo laboratório.

As fazendas A e B encontram-se localizadas no litoral leste, próximas ao estuário do Rio Jaguaribe. Na planície fluvial do Rio Jaguaribe estão instaladas 36 fazendas de camarão, compreendendo uma área total de 413 ha, identificando-se 32 em operação (350 ha) e quatro desativadas. O desenvolvimento da carcinicultura na região instiga à especulação sobre os aspectos ambientais inerentes às etapas de produção e, conseqüentemente, aos impactos provocados nos ecossistemas naturais. Os autores relatam que os efluentes das 32 fazendas pesquisadas, gerados pela troca de água dos

viveiros e pela despesca, são lançados nos corpos d'água sem tratamento prévio. O Rio Jaguaribe é destino final dos efluentes de 14 fazendas. O lançamento desses efluentes no Rio Jaguaribe é um risco para a saúde pública local, cujas águas abastecem a população das cidades de Russas, Jaguaruana, Quixeré e Itaiçaba (FIGUEIREDO et al., 2005),.

O estuário do Rio Acaraú, onde estão localizadas as fazendas C e D, está a oeste de Fortaleza e compreende uma área equivalente a 14.500 km² (ARAÚJO; FREIRE, 2007). Próximo ao estuário existem 32 fazendas de carcinicultura. De acordo com Brito et al. (2004), essa grande quantidade de fazendas próximas às áreas do estuário contribui para o excesso de matéria orgânica no ambiente e, conseqüentemente, para o aumento da comunidade bacteriana.

O crescente número de fazendas de camarão próximas às áreas estudadas levanta a preocupação com a qualidade da água e com a saúde dos camarões cultivados nelas. Felizmente, a maioria dos carcinicultores já reconhece a importância do gênero *Vibrio* no ambiente de cultivo, uma vez que, a segurança dos níveis viáveis para bactérias heterotróficas e para as espécies de víbrios é comumente utilizada como indicador de saúde ambiental. Contagens bacterianas de rotina desses grupos na água, hepatopâncreas e hemolinfa dos camarões são comuns no monitoramento da saúde dos animais (LÓPEZ-TORRES, 2001).

A qualidade do ambiente de cultivo é um fator que merece destaque. Os fatores ambientais podem se caracterizar como agentes estressantes, desencadeando condições favoráveis à instalação de processos infecciosos nos camarões. Temperaturas e pH extremos, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mudanças abruptas na salinidade e presença de

substâncias tóxicas são agentes estressantes em potencial, associados ao desequilíbrio no ambiente e à baixa qualidade da água. A captação de água contaminada, a aquisição de pós-larvas com elevada carga viral ou de baixa qualidade nutricional e a presença excessiva de outros organismos (dinoflagelados e cianofíceas) no ambiente de cultivo também podem causar enfermidades nos camarões (SOULAP, 1999). O estresse provoca o declínio das defesas naturais dos camarões deixando-os enfraquecidos e sujeitos a infecções, até mesmo por microrganismos oportunistas, como é o caso das doenças provocadas por bactérias Gram negativas do gênero *Vibrio* ou *Pseudomonas* (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Diversos estudos em crustáceos demonstram a habilidade de algum fator estressante influenciar no desenvolvimento bacteriano na hemolinfa (NOGA; ARROLL; FAN, 1996). Jussila et al. (2001) afirmam que o tempo de coagulação da hemolinfa pode aumentar sob um estresse fisiológico ou durante uma infecção. Segundo Perazzolo et al. (2002), o estudo do comportamento hemato-imunológico do camarão *Farfantepenaeus paulensis* em diferentes parâmetros ambientais e fisiológicos, tais como: salinidade, ablação das fêmeas e exterminação do espermátóforo masculino, comprovou a redução nos níveis de hemócitos, na concentração da proteína total e na atividade anticoagulante. Em outro trabalho realizado por Hsieh et al. (2008) foi observado que na resposta imune e fisiológica do camarão *Penaeus vannamei* frente ao *Vibrio alginolyticus*, após 72 h de exposição, ocorreu decréscimo de glicose, lactato e de lipídios na hemolinfa.

Boonyaratpalin (1990) observou um número reduzido de *Vibrio* spp. na hemolinfa de camarões aparentemente saudáveis. A presença do patógeno gera um processo inflamatório, seguido da melanização, tendo como

conseqüência o surgimento de manchas negras indicando necroses localizadas. Através dessas e de outras pesquisas, pode-se avaliar que o fator estresse afeta de alguma forma o sistema imunológico dos camarões, deixando assim, uma porta de entrada para agentes oportunistas.

As amostras analisadas confirmam a idéia proposta por Lightner (1977) de que a hemolinfa deve ser, se não estéril, pelo menos pouco contaminada. O que não isenta a presença de vibrios na hemolinfa de camarão, mesmo se o tempo de coagulação for baixo.

Os resultados das contagens de vibrios (SAC- e SAC+) nas quatro fazendas no período chuvoso, quando aplicado log 10, variaram de 0,78 a 7,18 log de UFC/mL. No período de estio esses números variaram de 0,78 a 7,32 log de UFC/mL (Tabelas 1, 2, 3 e 4 e Figura 11 e 12).

Figura 11. Gráfico do comportamento das Contagens Padrão em Placas (CPP) dos vibrios em Unidade Formadora de Colônias por mililitro (expressas em Log de UFC/mL) em amostras de hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* com 4 g e 8 g, coletados em quatro fazendas de cultivo, durante o período de chuva.

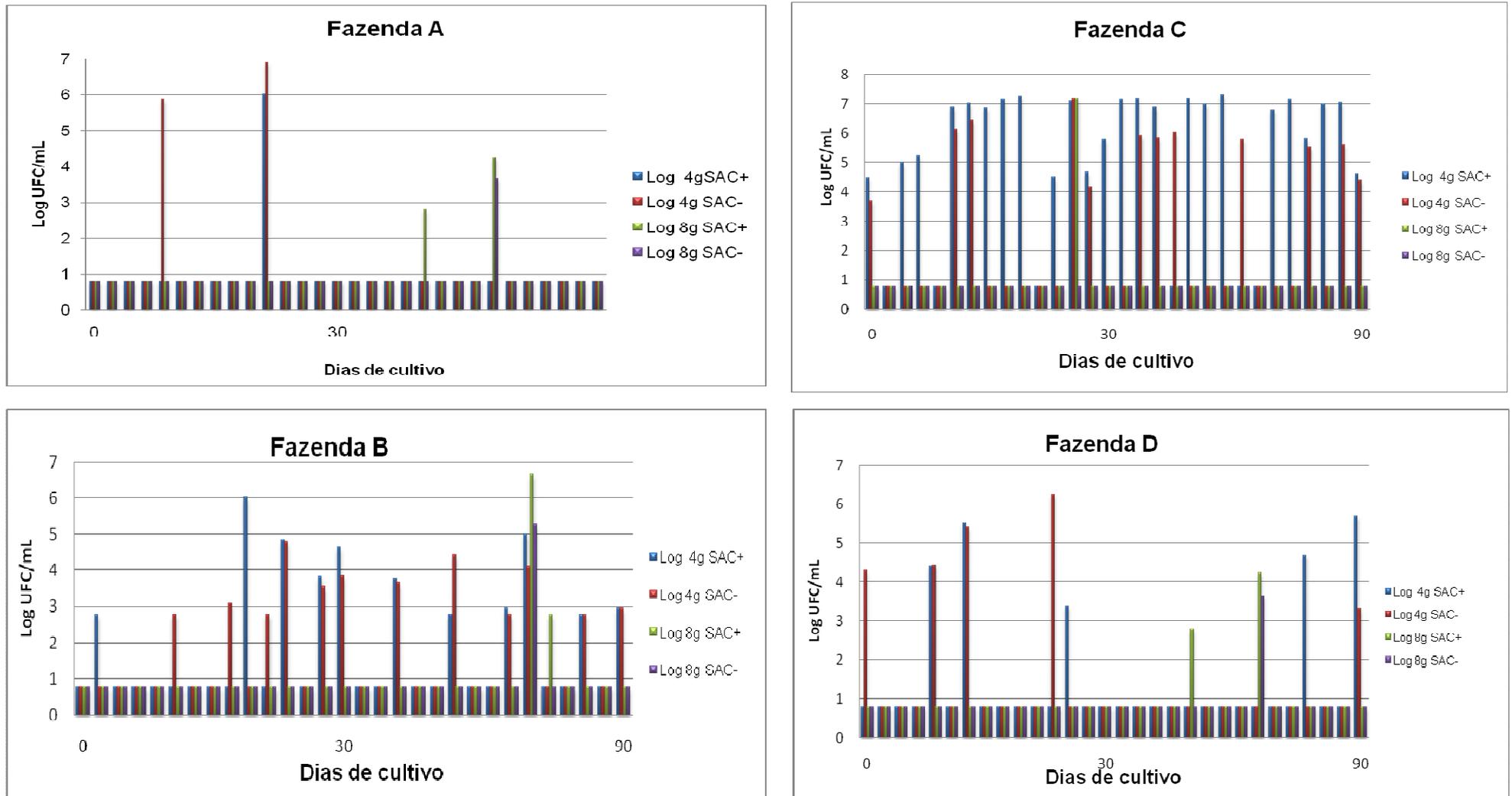
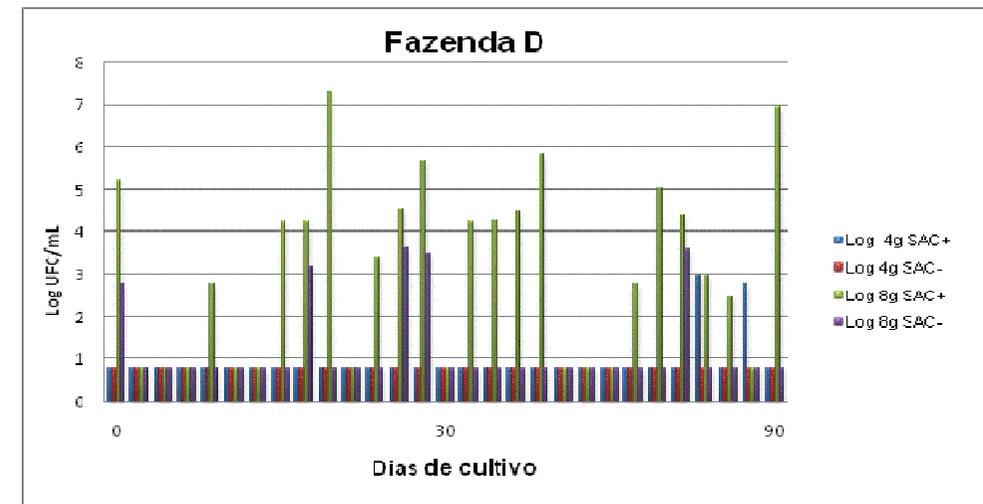
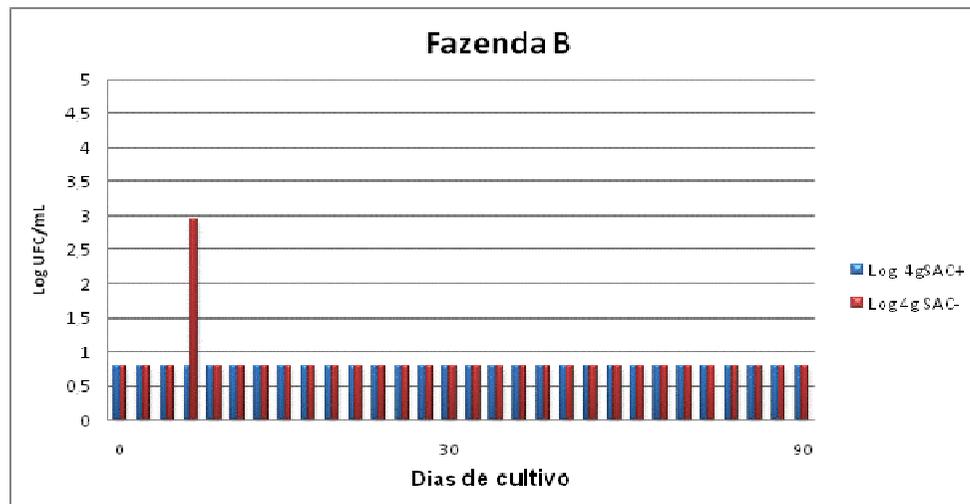
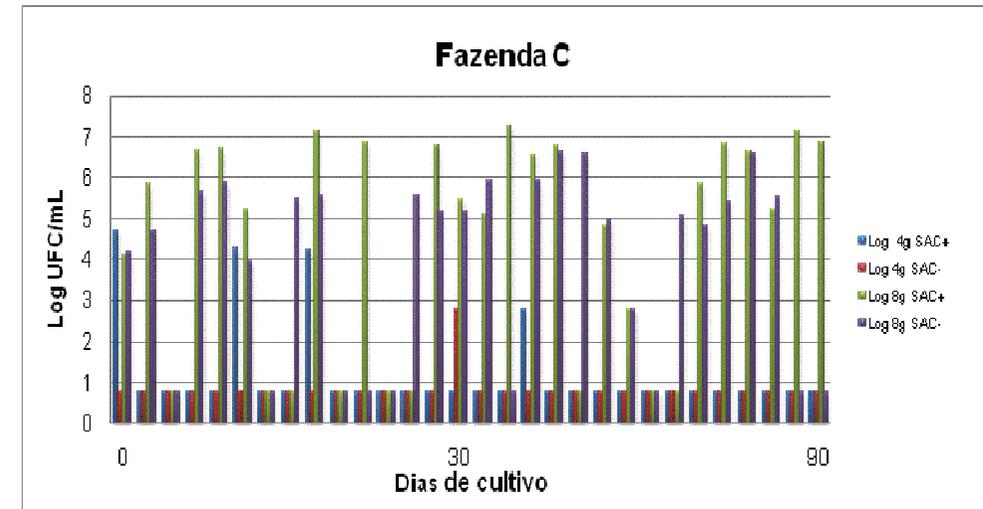
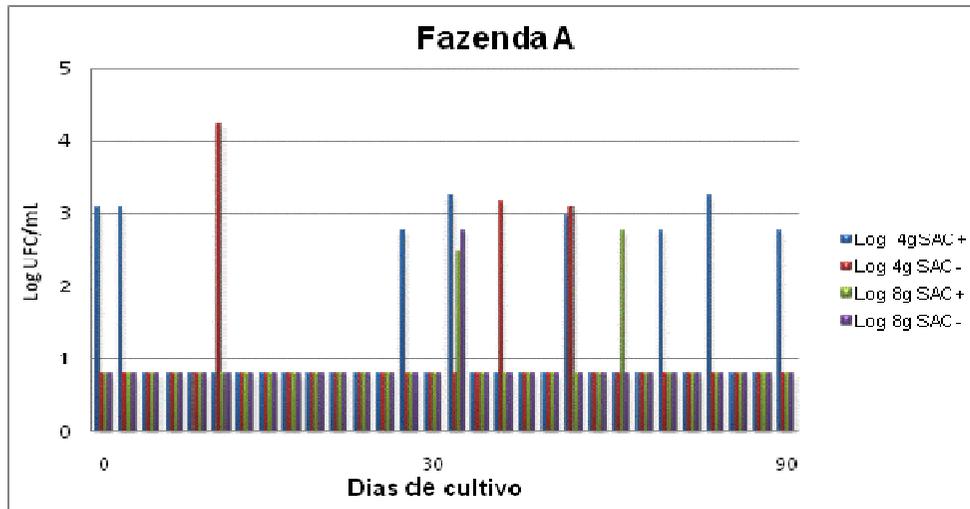


Figura 12. Gráfico do comportamento das Contagens Padrão em Placas (CPP) dos vírios em Unidade Formadora de Colônias por mililitro (expressas em Log de UFC/mL) em amostras de hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* com 4 g e 8 g, coletados em quatro fazendas de cultivo, durante o período de estio.



Ao analisar-se os resultados, é visível a predominância dos vibrios sacarose positivas na hemolinfa dos camarões no período chuvoso. Menezes (2005) ressalta que é comum os carcinicultores correlacionarem e controlarem as quantidades de vibrios sacarose positiva e negativa nos viveiros a fim de evitar o aparecimento de infecções. No entanto, não existe base científica que possa comprovar essa relação, podendo tanto vibrios sacarose positivas como negativas ser causas de infecção em animais aquáticos (VIEIRA et al., 2000).

Durante os períodos chuvoso e estio a temperatura da água se manteve entre 28°C e 30°C, característica de águas tropicais, o que favorece a proliferação de vibrios. Em estudo realizado por Thompson et al. (2004) sobre a diversidade e dinâmica de comunidade de vibrio na costa do Atlântico Norte, a temperatura se mostrou fundamental para ocorrência de vibrios na água, sendo detectado um aumento na população de vibrios durante o verão, quando as temperaturas alcançaram 30°C, fato também observado na presente pesquisa.

Estudos relacionados com o comportamento sazonal das espécies de vibrios patogênicos em ambientes naturais são encontrados na literatura científica (BARBIERI et al., 1999). Cavallo; Stabili (2004), em pesquisa sobre a biodiversidade de vibrios em águas da costa italiana, ressaltaram a correlação existente entre a temperatura da água e a presença de vibrios. Esses autores encontraram uma relação positiva entre a presença de *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. cholerae* não O1, *V. logei*, *V. hollisae*, *V. diazotrophicus* e *V. aestarinus* e a temperatura das águas de onde provinham as cepas. Outras pesquisas retratam a diversidade das estirpes isoladas dos sistemas de aquicultura marinha (GOMEZ-GIL et al., 1998). Mendes et al. (2007) avaliaram

exames a fresco associado à contagem e identificaram *Vibrio* spp. em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* e detectaram uma grande diversidade de vibrios nos períodos de estio e chuvoso no Estado de Pernambuco. As espécies encontradas foram: *V. parahaemolyticus*, *V. mediterranei*, *V. damsela*, *V. vulnificus*, *V. carchariae*, *V. anguillarum*, *V. metschnikovii*, *V. proteolyticus*, *V. hollisae*, *V. haliotocoli*, *V. proteoliticus*, *V. harveyi* e *V. mimicus*.

Foram isoladas 205 cepas de *Vibrio* da hemolinfa dos camarões das quatro fazendas, nos períodos de estio e chuvoso. Dessas, 114 foram isoladas no período chuvoso e 91 no período de estiagem. Das 114 cepas isoladas da hemolinfa dos camarões na estação chuvosa, 93 (81,57%) foram identificadas até espécie (Tabela 5). No período de estio esse valor foi de 76 (83,51%) (Tabela 6).

O maior número de isolamento recaiu sobre *Vibrio* spp. (não tendo sido possível a identificação dessas cepas até espécie), seguido de *Vibrio coralliilyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius II*, *V. alginolyticus*, *V. mediterranei*, *V. mimicus*, *V. vulnificus B1*, e outros com números inferiores ou iguais a três cepas (Tabela 5).

Tabela 5. Cepas de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa de camarões (*Litopenaeus vannamei*) com 4 g e 8 g, cultivados em quatro fazendas no Estado do Ceará, durante o período chuvoso.

Espécies <i>Vibrio</i>	Número de isolados
<i>Vibrio</i> spp	21
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	20
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
<i>Vibrio pelagius II</i>	11
<i>Vibrio alginolyticus</i>	9
<i>Vibrio mediterranei</i>	8
<i>Vibrio mimicus</i>	7
<i>Vibrio vulnificus</i> B1	4
<i>Vibrio diabolicus</i>	3
<i>Vibrio harveyi</i>	3
<i>Vibrio campelli</i>	3
<i>Vibrio hepatarius</i>	2
<i>Vibrio cholerae</i>	2
<i>Vibrio pelagius I</i>	1
<i>Vibrio littoralis</i>	1
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	1
Total	114

Nas amostras de hemolinfa coletadas durante o período de estio foram identificadas as espécies: *Vibrio pelagius II*, *Vibrio* spp., *V. coralliilyticus*, *V. mimicus*, *V. orientalis*, *V. diazotrophicus*, *V. campelli*, *V. rumoiensis* e outros em números inferiores ou iguais a 3 cepas.

Tabela 6. Cepas de *Vibrio* isoladas das amostras de hemolinfa de camarões (*Litopenaeus vannamei*) com 4 g e 8 g cultivados em quatro fazendas do Estado do Ceará, durante o período de estio.

Espécies <i>Vibrio</i>	Número de isolados
<i>Vibrio pelagius</i> II	20
<i>Vibrio</i> spp	15
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	13
<i>Vibrio mimicus</i>	10
<i>Vibrio orientalis</i>	9
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	5
<i>Vibrio rumoiensis</i>	4
<i>Vibrio campelli</i>	4
<i>Vibrio mediterranei</i>	3
<i>Vibrio vulnificus</i> B1	2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2
<i>Vibrio littoralis</i>	2
<i>Vibrio ponticus</i>	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1
Total	91

Observou-se maior diversidade de *Vibrio* nas amostras de hemolinfa de camarões no período chuvoso do que no estio. No entanto, este fato não descarta a possibilidade da ocorrência de surtos de vibriose nos camarões, em ambos os períodos, uma vez que se trata de bactérias oportunistas.

A distribuição em porcentagem de espécies isolada da hemolinfa de camarão, nos dois períodos estudados, encontra-se exposta nas Figuras 13 e 14.

Figura 13. Distribuição em porcentagem dos 114 isolados de *Vibrio* das amostras de hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com 4 g e 8 g no período chuvoso.

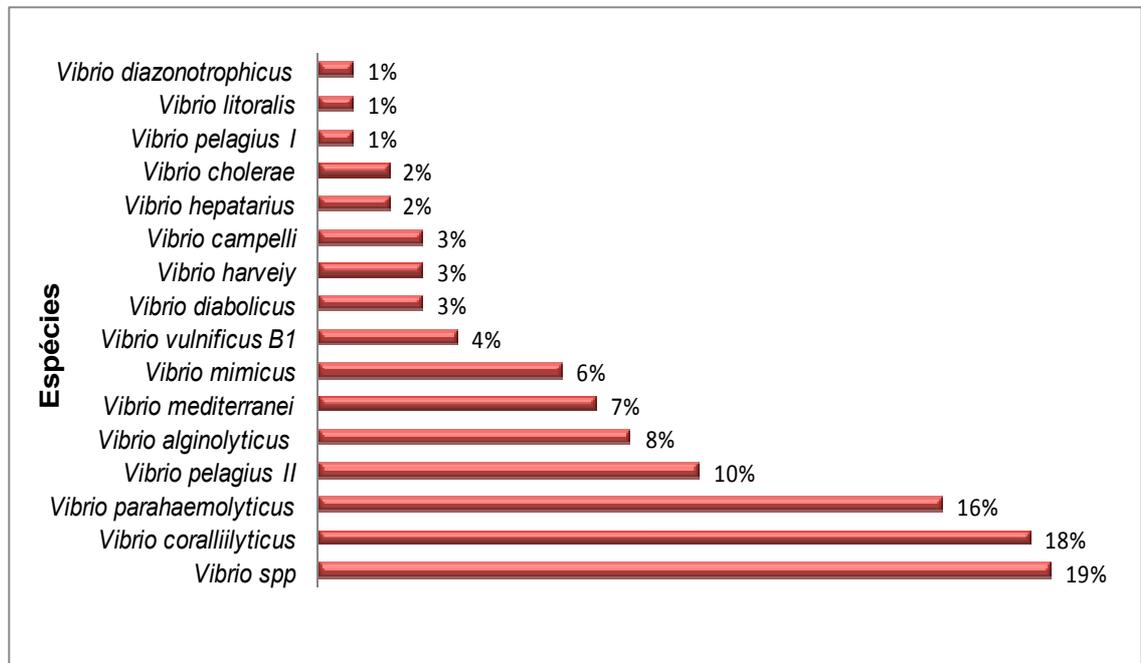
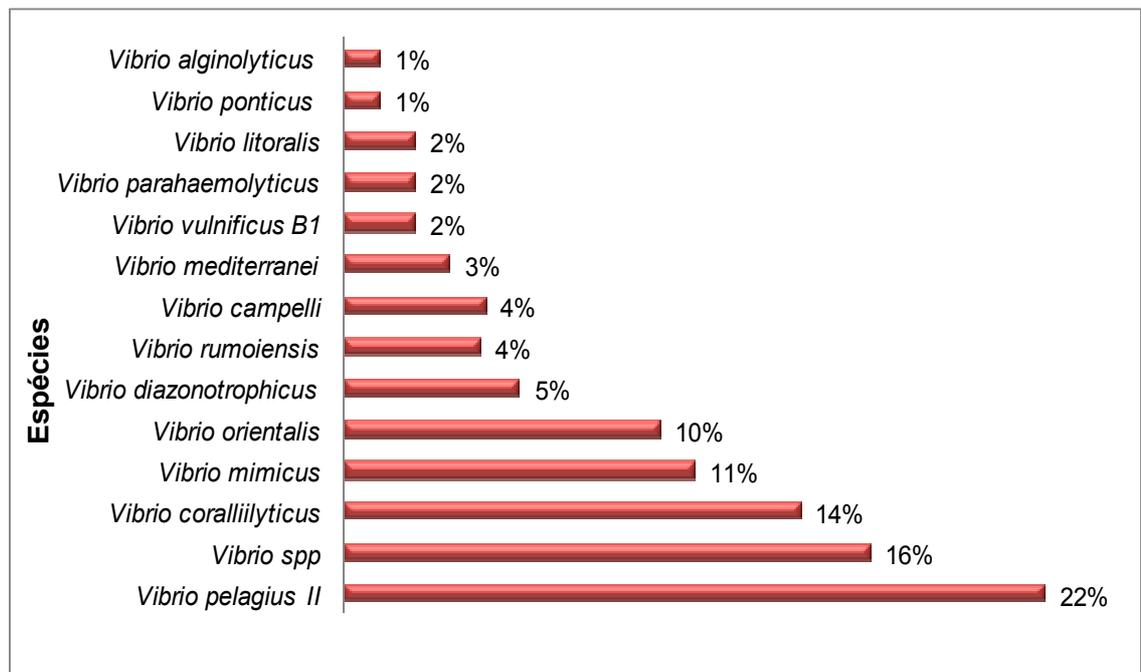


Figura 14. Distribuição em porcentagem dos 91 isolados de *Vibrio* das amostras de hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com 4 g e 8 g no período de estio.



Os números de cepas de *Vibrio* spp. isoladas no presente estudo, nos períodos sazonais (chuvoso e estio) foram elevados, concordando com Thompson; Frelie; Lawrence (1994) que afirmam que concentração de *Vibrio* spp. varia temporariamente dentro dos viveiros durante o ciclo completo de cultivo de camarões.

Espécies novas de víbrios foram isoladas na presente pesquisa, dentre as quais destacam-se: *Vibrio coralliilyticus*, *V. littoralis* e *V. ponticus*. A espécie *V. coralliilyticus* foi confirmada em números relativamente altos, nos dois períodos. Os trabalhos com essa espécie relatam sua alta patogenicidade em relação aos corais. Segundo Haim; Kerem; Rosenberg (2003), *V. coralliilyticus* pode causar necrose nos tecidos do coral *Pocillopora damicornis* quando incubado em temperaturas entre 27 e 29°C.

V. littoralis foi isolada recentemente do Mar da Coreia. Segundo Nam et al. (2007), a espécie possui uma similaridade com *Vibrio rumoiensis* chegando a 98,65%, podendo crescer à temperatura de até 45°C. É possível que o isolamento dessas espécies durante o estio, seja influenciado pelas altas temperaturas encontradas nos locais de coleta pois a temperatura da água se manteve entre 28°C e 30°C.

Macián et al. (2004) isolaram *Vibrio ponticus* de peixes dourados (*Sparus aurata*), de mexilhões e da água do mar na costa mediterrânea da Espanha. Os autores observaram que esta espécie possui uma similaridade com as espécies *V. fluvialis* e *V. furnissii*, sendo que esta espécie é, segundo Hosseini et al.(2004) indígena de ambiente marinho e do camarão.

As espécies que predominaram nos períodos estudados foram: *V. coralliilyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius II*, *V. alginolyticus*, *V.*

mediterranei, *V. mimicus*, *V. vulnificus* B1. Essas espécies têm importância nos cultivos por estarem relacionadas com surtos de vibriose nos camarões.

Na pesquisa realizada por Gopal et al. (2005) sobre a ocorrência de espécies de *Vibrio* em hemolinfa de camarões da costa leste e oeste da Índia, foi relatada a predominância de três espécies: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. pelagius*. As espécies observadas pelo autor são às mesmas identificadas na presente pesquisa.

Sung et al. (2001) observaram altos índices de mortalidades no cultivo do camarão *Penaeus monodon* em Taiwan, associadas às espécies *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*. Vaseeharan; Ramasamy (2003) retrataram que a presença de *V. parahaemolyticus* em corpos aquáticos destinados ao cultivo de camarões é um fator relevante, uma vez que algumas cepas podem provocar doenças nos peneídeos. Outrossim, Longyant et al. (2008) observaram através de estudos histológicos que *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são responsáveis por infecções no hepatopâncreas do camarão *Penaeus vannamei*. Martins (2003) enfatizou que a presença das espécies *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* e *V. fluvialis* pode indicar um risco para a saúde dos camarões por serem espécies que estão associadas com enfermidades em vários cultivos de camarão marinho no mundo. Essas pesquisas ressaltam a importância dos estudos relacionados com a sanidade dos organismos aquáticos.

V. harveyi é um patógeno responsável pelo fenômeno de luminescência associado a elevadas mortalidades no estágio larval dos camarões peneídeos (CHRISOLITE et al., 2008). De acordo com Lavilla-Pitoggo et al. (1990), a vibriose luminescente é uma enfermidade de grande importância nos cultivos

de *Penaeus monodon* nas Filipinas. Diggles et al. (2000) enfatizam que a espécie é responsável por altas mortalidades em cultivos quando a temperatura da água está em torno de 20°C. Os animais afetados ficam com o corpo opaco, apresentando manchas vermelhas pequenas e com os pereiópodos e as extremidades ligeiramente luminosas.

V. alginolyticus foi detectado na hemolinfa dos camarões nas duas estações analisadas. A espécie é um importante patógeno para a aquicultura, pois causa danos nos cultivos de camarões (HÖRMANSDORFER et al., 2000). Vandenberghe et al. (1998) observaram que durante a produção de *P. chinensis* a presença *V. alginolyticus* foi a espécie bacteriana predominante no estágio larval de camarões saudáveis. Apesar de causar doenças em animais aquáticos, essa espécie tem sido utilizada como probiótico. De acordo com Gómez; Balcázar; Shen (2007), o uso de *Vibrio alginolyticus* como probiótico é recomendado para aumentar a sobrevivência e crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei*, permitindo aparentemente a exclusão competitiva entre bactérias potencialmente patogênicas, reduzindo ou eliminando a necessidade da profilaxia antibiótica na larvicultura de sistema intensivo.

O isolamento do *V. mimicus* foi acentuado nos camarões analisados corroborando com a afirmação de Karunasagar; Otta; Karunasagar (1997) de que a bactéria está relacionada com infecções secundárias em camarões *Penaeus monodon*. Chowdhury et al. (1991) relatam que *V. mimicus* pode ser isolado em grande quantidade no ambiente, incluindo em ostras, camarões, rios e em águas salobras.

Para Olafsen (2001), um nível elevado de heterogeneidade microbiana nos sistemas de cultivo pode muitas vezes contribuir para reduzir a

vulnerabilidade dos animais. Entretanto, Zhang; Austin (2000) afirmam que o número elevado de vibrios na aquicultura marinha é ameaça para os animais, uma vez que várias delas podem causar doenças infecciosas.

Na presente pesquisa, foi constatada a presença de estirpes patogênicas ao homem, que merecem destaque, a saber: *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*. Concordando com essa pesquisa, Gopal et al., (2005) alertaram para a qualidade bacteriológica do camarão cultivado em águas ricas em vibrios, principalmente *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, pois essas espécies estão associadas a gastroenterites em humanos.

V. parahaemolyticus é um patógeno humano e está amplamente distribuído no ambiente marinho. Esse microrganismo é freqüentemente isolado de mariscos, particularmente de ostras (SU; LIU, 2007). Segundo Pereira et al. (2007) *V. parahaemolyticus* representa uma bactéria emergente devido a sua associação com surtos epidêmicos após o consumo de alimentos, em especial pescados consumidos *in natura* ou ligeiramente submetidos à cocção. Os sintomas mais freqüentes da doença são: diarreia aquosa, cólicas abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça e febre. Na cidade de Cascavel (CE) ocorreu um surto de gastroenterite atingindo adultos e crianças. A análise microbiológica das fezes de uma criança, acometida com a doença, revelou a presença de *V. parahaemolyticus* (HOFER, 1983). Em pesquisa realizada em pescadores do município de Raposa (MA), foi constatada que uma das bactérias responsáveis pelas lesões cutâneas era *V. parahaemolyticus* (42,8%) (RODRIGUES, et al., 2001) Essas Infecções instalam-se após exposição a ambientes aquático e as lesões começam com

feridas pequenas, às vezes já preexistentes, ou através de lacerações causadas por acidentes no local de trabalho (LEVINE; GRIFFIN, 1993).

Segundo Hofer; Silva (1986), algumas cepas hemolíticas de *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivas, são geralmente isoladas de material fecal de pacientes com gastroenterite, enquanto que as isoladas de amostras ambientais e de alimentos são, em cerca de 99% dos casos, Kanagawa negativas, mesmo se referidos alimentos estiverem envolvidos em casos de toxinfecção.

V. cholerae, não aglutinável, foi isolado somente no período chuvoso, corroborando com Castro-Rosas; Escartin (2002) de que os fatores e mecanismos que afetam a sobrevivência de *V. cholerae* no ambiente aquático não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que este patógeno é capaz de se agregar a outras superfícies bióticas: fitoplâncton, zooplâncton e nas carapaças de crustáceos. Essa afirmação é demonstrada na pesquisa realizada por Gonçalves et al. (2004), onde cinquenta e cinco isolados de *V. cholerae* não O1 foram provenientes de 14 amostras de zooplâncton. As superfícies desses organismos favorecem às condições de sobrevivência para o patógeno se proteger contra fatores ambientais estressantes (COSTERTON et al., 1987).

V. cholerae é um dos mais conhecidos vibrios que causam patogenicidade aos humanos por ser o disseminador da cólera, uma doença epidêmica e pandêmica (MENEZES, 2005). Nogueira; Rodrigues; Hofer (2002) destacam que *V. cholerae* sorogrupo O1, independente do sorotipo, é capaz de se manter em água com salinidades abaixo de 0,5‰ e em diferentes temperaturas por períodos suficientes para sua disseminação através de “corpos de água”, demonstrando a necessidade de monitoramento constante

em áreas de possível contaminação, principalmente onde a água é utilizada para o consumo, evitando assim, a disseminação da doença para as populações próximas a esses ambientes.

V. vulnificus biótipo 1 foi isolado nas estações sazonais pesquisadas. Segundo Biosca et al. (1996), essa espécie é um patógeno humano oportunista, capaz de causar septicemia primária, após a ingestão de moluscos crus. Essa espécie encontra-se distribuída na superfície ou em organismos marinhos e estuarinos de vertebrados e invertebrados, sendo, na maioria dos casos, comercialmente importantes no mundo (PARVATHI et al., 2004).

Foram observados altos valores de *Vibrio* nas amostras de hemolinfa dos camarões cultivados. Apesar da diversidade encontrada nas amostras de hemolinfa, não se pode afirmar qual espécie é mais prejudicial aos camarões, já que os fatores de virulência das espécies do gênero *Vibrio* são muito variáveis entre elas e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram observadas altas contagens de *Vibrio* na hemolinfa dos camarões cultivados em todas as fazendas estudadas.
- Os camarões provenientes das fazendas C e D, localizadas no estuário do Rio Acaraú, apresentaram números de *Vibrio* em suas hemolinfas mais altos do que os camarões provenientes de fazendas situadas no Estuário do Rio Jaguaribe no período de estio. No período chuvoso a fazenda C foi a que apresentou camarões com hemolinfas mais contaminada.
- Os camarões oriundos das fazendas C e D, tanto com 4 g como com 8 g, apresentaram maiores quantidades de *Vibrio* SAC+ do que SAC- em suas hemolinfas. Na fazenda A ocorreu o contrário, mais SAC- do que SAC+ nos dois tamanhos de camarão no período de estio. No período de estio a hemolinfa dos camarões com 8g das Fazendas C e D estava mais contaminada com *Vibrio* do que a hemolinfa dos camarões com 4 g das mesmas fazendas.
- De uma maneira geral, as contagens de *Vibrio* total nas hemolinfas de camarão de 4 g e 8g foram mais altas no período chuvoso .
- A fazenda A foi a que apresentou camarões com a hemolinfa com o tempo de coagulação maior, entretanto a fazenda C foi a que apresentou números mais altos de *Vibrio* na hemolinfa dos camarões, o que necessariamente não implica em mortalidade pois a referida fazenda foi a que apresentou maior taxa de sobrevivência dos animais.
- Não houve correlação entre a quantidade de víbrios presentes na hemolinfa e o tempo de sua coagulação.

- Nas amostras de hemolinfa dos camarões as espécies que predominaram nos períodos estudados foram: *V. coralliilyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius II*, *V. alginolyticus*, *V. mediterranei*, *Vibrio mimicus* e *V. vulnificus B1*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC - Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho. Impacto sócio-econômico da carcinicultura do Nordeste. **Revista da ABCC**, Recife, ano 7, n. 3, p.1-13, set. 2005.

ABCC. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho. O agronegócio do camarão marinho cultivado. **Revista da ABCC**, Recife, ano 4, n. 1, p. 60-64, 2005.

AGUIRRE-GÚZMAN, G.; RUÍZ, H. M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 15, p. 1395-1404, Dec. 2004.

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.

ARANA, L. V. Aqüicultura e desenvolvimento sustentável. Subsídios para formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 310, 1999.

ARAÚJO, M. V.; FREIRE, G. S. S. Utilização do SIG nos estudos ambientais do estuário do rio Acaraú–Ceará. **Geonomos**, Belo Horizonte, v. 15, n. 2, p. 9-19, 2007.

AUSTIN, B.; ZHANG, X. H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 2 p. 119-124, July 2006.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control: introduction. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, n. 1-3, p. 3-11, Nov. 2000.

BALDWIN, J. D.; BASS, A. L.; BOWEN, B. W.; CLARK, W. H. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 10, n. 3, p. 399-407, Dec. 1998.

BARBIERI JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos – Engorda**, v. II, Viçosa: Aprenda Fácil, 2002.

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**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2748-2753, June 1999.

BARRACCO, M. A.; PERAZOLLO, L. M.; ROSA, R. D. **Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões**. 80 p. 2007. Disponível em: <<http://www.liaaq.ufsc.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

BARRACO, A. M.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZINI-PAIVA, TAKEMOTO, R.; LIZAMA, M. (eds.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Ed. Varela, p. 51-74, 2004.

BARROSO, F. E. C. **O efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* (Rhodophyta, Rhodimenniales) na sobrevivência de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, adaptadas em águas oligohalinas**. 67 f. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BAUMANN, P.; FURNISS, A. L.; LEE, J. V. Genus 1, *Vibrio*. In: KRIEG, P. N. R.; HALT, J.G. (eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. v. 1. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 518–538, 1984.

BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREM, M.; ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4236-4242, July 2003.

BEVERIDGE, M. C. M. **Cage aquaculture**. 2nd ed. Cambridge: Fishing News Books. 346 p. 1996.

BIOSCA, E. G.; AMARO, C.; MARCOS-NOALES, E.; OLIVER, J. D. Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 450-455, Feb.1996.

BOAVENTURA, M.; CANUTO, A.; FERREIRA, A. Novas diretrizes no cultivo de camarão cinza *Litopenaeus vannamei* para o controle das enfermidades. **Revista de Aquicultura & Pesca**, São Paulo, n. 17, p. 25-28, 2006.

BOONYARATPALIN, S. Shrimp larval diseases. In: NEW, M. B.; SARAM, H.; SINGH, T. (eds.). Technical and economic aspects of shrimp farming. **Proceedings of the Aquatech '90 Conference**, Kuala Lumpur, Malaysia. 1990.

BORGHETTI, J. R.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, N. R. B. **Aqüicultura - uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. GIA Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais. Curitiba, p. 129,2003.

BOWMAN, T. E.; ABELE, L. G. Classification of the recent Crustacea. In: ABELE, L. G. (ed.). **The Biology of Crustacea: systematics, the fossil record and biogeography**. New York: Academic Press, v. 1. p. 1-27, p. 319, 1982.

BOYD C. E. Códigos de praticas para el cultivo responsable de camarón. Saint Louis. **Alianza Global de Acuicultura**, p. 36 1999.

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*. **Anais... IX Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental** – ENAMA, Curitiba, p. 151, 2004.

BROCK, J. A.; LEAMASTER, B. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: WYBAN, J. (ed.). **Proceedings... Special Sessions on Shrimp Farming**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, p. 212-226, 1992.

BUENO, S. L. S. Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large scale rearing conditions. **Journal of the World Aquaculture**, Baton Rouge, v. 2, n. 3, p. 170-179, Apr. 1990.

CASTRO-ROSAS, J.; ESCARTÍN, E. F. Adhesion and colonization of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 3, p. 492–498, Mar. 2002.

CAVALLO, R. A.; STABILI, L. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). **Scientia Marina**, Barcelona, v. 68, n. 1, p. 23-29, Apr. 2004.

CHANRATCHAKOOL, P.; TURNBULL, J. F.; FUNGE-SMITH, S.; LIMSUWAN, C. **Health management in shrimp ponds**. 2nd ed. Aquatic Animal Health Research Institute Department of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok, 1995.

CHIU, C. H.; GUU, Y. K.; LIU, C. H.; PAN, T. M.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 23, n. 2, p. 364–377, Aug. 2007.

CHOWDHURY, M. A. R.; MIYOSHI, S. I.; YAMANAKA, H.; SHINODA, S. Virulence potentials of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. **Biomedical Letters**, Cambridge, v. 46, n. 182, p. 97–101, Mar. 1991.

CHRISOLITE, B.; THIYAGARAJAN, S.; ALAVANDI, S. V.; ABHILASH, E. C.; KALAIMANI, N.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T. C. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 275, n. 1-4, p. 13-19, Mar. 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 17th ed. CLSI/NCCLS M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2007.

COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B. F.; HAYBALL, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.14, n. 4, p. 333-345, Apr. 2003.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 435–464, Oct. 1987.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 235, n. 1-4, p. 513–551, June 2004.

DANTAS, D. D. M. **Desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probióticos quando submetido à infecção com *Vibrio harveyi*.** 2008. 44 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFPE, Recife, 2008.

DAVIS, B. R.; FANNING, G. R.; MADDEN, J. M.; STEIGERWALT, A. G.; BRADFORD JR, H. B.; SMITH JR, H. L.; BRENNER, D. J. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 14, n. 6, p. 631–639, Dec. 1981.

DIAS, M. C. O. **Manual de impactos ambientais:** orientações básicas sobre aspectos de atividades produtivas. Fortaleza: Banco do Nordeste, 158 p. 1999.

DIGGLES, B. K.; MOSS, G. A.; CARSON, J. ANDERSON, C. D. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 43, n. 2, p. 127-137, Nov. 2000.

DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4th ed. Washington: APHA, 600 p. 2001.

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH**
Disponível em:
<<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>> Acesso em 05 de janeiro de 2009).

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.** 8th ed. AOAC International, Gaithersburg MD, p. 9.01-9.27, 1995.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries Statistics** – Aquaculture. FIGIS online. 2007. Disponível em: <www.fao.org> Acesso em: 20 set. 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World's Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p. 92, 2002.

FARMER III, J. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (eds.). **The Prokaryotes**. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, and applications. 2nd ed. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. v. II. p. 2952 e 3011. 1992.

FARMER III, J. J.; JANDA, J. M.; BRENNER, F. W.; CAMERON, D. N.; BIRKHEAD, K. M. Genus 1. *Vibrio* Pacini 1894, 411^{AL}. In: **Bergery's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed, v. 2. The Proteobacteria part B the Gammaproteobacteria. BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (eds.). p. 494-546, 2005.

FIGUEIREDO, M. C. B.; ARAÚJO, L. F. P.; GOMES, R. B.; ROSA, M. F.; PAULINO, W. D.; MORAIS, L. F. S. Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura em águas interiores. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 167-174, abr./jun. 2005.

FONSECA, C.; ROCHA, I. P. **Cartilha de boas práticas de manejo na fazenda para prevenir e controlar enfermidades do camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil**. Recife: ABCC. 62 p. out. 2004. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/CartilhaIMNV.pdf>> . Acesso em: 12 dez. 2008.

FRANCISCO, A. K. **Relações genéticas em plantéis de reprodutores do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, através do seqüenciamento dos genes RNAr 16 e COI do DNAm**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

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, 2004.

GESTEIRA, T. C. V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira In: SILVA-SOUZA, A. T. (ed.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa. p. 287. 2006.

GOMEZ, J. M.; FAJARDO, R.; PATIÑO, J. F.; ARIAS, C. A. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 3427–3429, July 2003.

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

GOMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROGUE, 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. 1-2, p. 1-9, Apr. 1998.

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 Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 151-159, July 2005.

GUZMÁN, G. A.; VALLE, A. F. Infections disease in shrimp species with aquaculture potential. **Recent Research Developments in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 333-348, 2000.

HERNÁNDEZ, J. Z.; NUNES, A. J. P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. **Revista da ABCC**, Recife ano 2, n. 3, p. 55-59, 2001.

HÖRMANSDORFER, S.; WENTGES, H.; NEUGEBAUR-BÜCHELER, K. N.; BAUER, J. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 203, n. 2, p. 169-175, Oct. 2000.

HOSE, J. E.; MARTIN, G. G.; GERARD, A. S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 178, n. 1, p. 33-45, Feb. 1990.

HOSSEINI, H.; CHERAGHALI, A. M.; YALFANI, R.; RAZAVILAR, V. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. **Food Control**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 187-190, Apr. 2004.

HSIEH, S. L.; RUAN, Y.H.; LI, Y. C.; HSIEH, P. S.; HU, C. H.; KUO; C. M. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 275, n. 1-4, p. 335-341, Mar. 2008.

HUQ, M. I.; ALAM, A. K. M. J.; BRENNER, D. J.; MORRIS, G. K. Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, n. 6, p. 621-624, June 1980.

IGARASHI, M. A. **Estudo sobre o cultivo do camarão marinho**. Fortaleza: Edições SEBRAE, 1995.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of in vertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Marrickville, v. 38, n. 2, p. 128-150, Mar. 2005.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil, de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, nº3, p. 174-175, 1983.

HOFER, E. & SILVA, C. H. D. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no litoral brasileiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, 327-331, 1986.

JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **Journal of the World Aquaculture Society**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 523–532, Dec. 2006.

JOHANSSON, M. W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SODERHALL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, n. 1-3, p. 45–52, Nov. 2000.

JOHANSSON, M. W.; SÖDERHÄL, K. Cellular immunity in crustacean and the proPO system. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 5, n. 6. p. 171-176, June 1989.

JONES, T. H; HUNT, R. D; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, p. 1415, 2000.

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**, Amsterdam, v. 199, n. 1-2, p. 185-193, July 2001.

KANEKO, T.; COLWELL, R. R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 113, n. 1, p. 24-32, Jan. 1973.

KARUNASAGAR, I.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the West coast of India. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 9-13, June 1997.

KARUNASAGAR, I.; PAI, R.; MALATHI, G. R.; KARUNASAGAR, I. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 128, n. 3-4, p. 203-209, Dec. 1994.

KAYSNER, C. A. *Vibrio* species. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. (eds.). **The Microbiological Safety and Quality of Foods**. Aspen Publishers Inc.: Gaithersberg, Maryland, USA, p. 1336-1362, 2000.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, C. WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 1465, 2001.

KOTHARY, M. H.; LOWMAN, H.; MCCARDELL, B. A.; TALL, B. D. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like haemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 3213–3220, June 2003.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; BATICADOS, M. C. L.; CRUZ-LACIERDA, E. R.; DE LA PENA, L. D. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 1-13, Dec. 1990.

LE MOULLAC, G; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, n. 1-3, p. 121-131, Nov. 2000.

LEE, J. H.; KIM, G. T.; LEE, J. Y.; JUN, H. K.; YU, J. H.; KONG, I. S. Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1384, n. 1, p. 1–6, Apr. 1998.

LEE, J. V.; DONOVAN, T. J.; FURNISS, A. L. Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschnikovii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 28, n. 1, p. 99–111, Jan. 1978.

LEE, J. V.; SHREAD, P.; FURNISS, A. L. The taxonomy of group F organisms: relationships to *Vibrio* and *Aeromonas*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 45, n. 1, p.73-94, 1978.

LENOCH, R. **Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de taura e a doença da mancha branca**. 86 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2004. Disponível em: <http://www.crmrsc.org.br/universidade/universidade_0016.pdf> Acesso em: 10 dez. 2008.

LEVINE, W. C.; GRIFFIN, P. M. *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of first year of regional Surveillance. **The Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 167: 479-483, Fed., 1993.

LIGHTNER, D. V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, p. 305, 1996.

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

LIGHTNER, D. V. **Manual de patologia y procedimientos de diagnóstico para enfermedades de camarones peneidos**. [S.l.]: Universidad Autónoma Metropolitana 1997.

LIGHTNER, D. V. Shrimp virus diseases: diagnostic, distribution and management. In: WYBAN, J. (ed.) Proceedings of the special session on shrimp farming. Florida. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, p. 238-253, 1992.

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

LIU, C. H.; CHENG, W.; HSU J. P.; CHEN, J. C. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 61, n. 1-2, p. 169-174, Oct, 2004.

LONGYANT, S.; RUKPRATANPORT, S.; CHAVISUTHANGKURA, P.; SUKSAWAD, P.; SRISUK, C.; SITHIGORNGUL, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; SITHIGORNGUL, P. Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 63-68, May 2008.

LÓPEZ-TORRES, M. A. La importancia de conte os bacterianos en Acuicultura. **Panorama Acuícola**, El Dorado, v. 6, n. 1, p. 34-35, 2001.

LORENZO, F. M. Produção pós-larval do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Como a indústria de larvicultura respondeu aos desafios da década passada. **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n. 2, p. 26-34, 2004.

MAA (Ministério da Agricultura e do Abastecimento) **Programa Nacional de Apoio ao Desenvolvimento do Cultivo de camarão Marinho**. Secretaria Executiva Departamento de Pesca e Aquicultura. Brasília, DF, p. 35. Ago 1999.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACHADO, Z. L. **Camarão marinho, cultivo, captura conservação, comercialização**. 2. ed. Recife: SUDENE, p. 250, 1998.

MACIÁN, M. C.; GARAY, E.; GRIMONT, P. A. D.; PUJALTE, M. J. *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*-*V. furnissii* Clade, isolated from gilthead sea bream, mussels and seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 27, n. 5, p. 535-540, May 2004.

MACIEL, M. L. T.; ANDREATTA, E.; COSTA, S. W.; MACIEL, C. T.; MARQUES, M. R. F. Avaliação de riscos sanitários potenciais em cultivos do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado de Santa Catarina (Brasil). In: **II CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE AQUICULTURA II CIVA**. p. 223-230. 2003.

MAIA, E. P.; NUNES, A. J. P. Cultivo de *Farfantepenaeus subtilis*: resultados das performances de engorda. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 79, p. 36-41, 2003.

MARTINS, P. C. M. Cultivo de camarão marinho. In: Sousa, S. T. A. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. SILVA-SOUZA, A. T. (ed.). p. 121-135. Maringá: Abrapoa. 287 p. 2006.

MARTINS, P. C. M. **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**. 117 f. 2003. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 2003.

MATTÉ, M. H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, M. L.; MALUCELLI, M. I. C.; NITRINI, S. M. O. O.; MATTÉ, G. R. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 747-751, June 2007.

MENDES, E. S.; BARRETO, A. C. G.; GÓES, L. M. N. B; GUIMARÃES, J. M.; NASCIMENTO, D. L.; DINIZ-FILHO, R. S.; MENDES, P. P. Avaliação do exame a fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 2, p. 7-15, jul./dez. 2007.

MENEZES, F. G. R. **Diversidade de *Vibrio* spp em estuários no estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura**. 84 f. 2005. Dissertação. (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 762, 2004.

NAM, Y. D.; CHANG, H. W.; PARK, J. R.; KWON, H. Y.; QUAN, Z. X.; PARK, Y. H.; KIM, B. C.; BAE, J. W. *Vibrio litoralis* sp. nov., isolated from a Yellow Sea tidal flat in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 3, p. 562-565, Mar. 2007.

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**, London, v. 6, n. 6, p. 403-412, Aug. 1996.

NOGUEIRA, J. M. R.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. Viabilidade de *Vibrio cholerae* O1 em diferentes tipos de águas em condições experimentais. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1339-1345, set./out. 2002.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 175–185, July 2008.

NUNES, A. J. P. **Fundamentos da engorda de camarões marinhos**. São Lourenço da Mata: Purina do Brasil, p. 48, 2004.

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

OLAFSEN, J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, n. 1-2, p. 223–247, Aug. 2001.

PARVATHI, A.; KUMAR, H. S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters from two estuaries along the southwest coast of India, using molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6909-6913, Nov. 2004.

PERAZZOLO, L. M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACO, M. A. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 214, n. 1-4, p. 19-33, Nov. 2002.

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.

PEREIRA, C. S., POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 787-792, out./dez. 2007.

PERÉZ-FARFANTE, J.; KENSLEY, B. Penaeid and sergestoid shrimp and prawns of the world. In: **Key of diagnoses for the families and genera**. Washington, NOA. p 223. 1997.

RAGUÉNÈS, G.; CHRISTEN, R.; GUEZENNEC, J.; PIGNET, P.; BARBIER, G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 989-995, Oct. 1997.

RAMIREZ-TORO, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulante do sistema imune.** 153 f. 2005. Tese. (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/6185/1/Tese_qualif4.pdf> Acesso em: 10 dez. 2008.

RENGPIPAT, S.; PUSIRIRIT, S.; RUKPRATANPORN, S. Differentiating between isolates of *Vibrio vulnificus* with monoclonal antibodies. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 398-404, Dec. 2008.

RIPPEY, S. R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 4, p. 419-425, Oct. 1994.

ROCHA, I. P. Agronegócio do camarão cultivado: uma nova ordem econômica social para o litoral nordestino. **Revista da ABCC**, Recife, ano 1, n. 1, p. 23-30, 2000.

ROCHA, I. P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. **Revista da ABCC**, Recife, ano 10, n. 1, p. 20-23, 2008.

ROCHA, I. P. Impactos sócio-econômicos e ambientais de carcinicultura brasileira: mitos e verdade. **Revista da ABCC**, Recife, ano 7, v. 4, n. 7, p. 29-36, 2005.

ROCHA, I. P.; MAIA, E. P. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira. **Anais... Aquacultura Brasil**. Recife, v. 1, p. 213-235, 1998.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. Carcinicultura brasileira: desenvolvimento tecnológico, sustentabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da ABCC**, Recife, ano 9, n. 1, p. 16-22, 2007.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J. **O agronegócio do camarão cultivado em 2003.** ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão), Recife, PE, 2004.

RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, Recife, ano 7, v. 7, p. 38-44, 2005.

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 da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 407- 411, Jul- Ago., 2001..

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole, 481 p., 2003.

ROSENBERRY, B. **World shrimp farming**. San Diego, p. 1-164, 1998.

SAMPAIO, Y.; COSTA, E. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, Recife, ano 5, n. 1, p. 60-64, 2003.

SANTOS, M. L.; CARVALHO, R.; ALENCAR, R.; PEREIRA-NETO, A.; FONCESCA, C. S.; PEREGRINO, L. H. **Programa de biossegurança para fazendas de camarão marinho**. Recife: ABCC. p. 1-61, 2005. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/download/MANUAL%20DE%20BIOSSEGURAN%C7A.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

SHANDERA, W. X.; JOHNSTON, J. M.; DAVIS, B. R.; BLAKE, P. A. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 99, n. 2, p. 169–171, Aug. 1983.

SILVA, R. P. P. **Fatores interferentes na frequência da vibriose em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) no litoral sul de pernambuco**. 51 f. 2007. Dissertação. (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura) Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRP, Recife, 2007.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 15, n. 1, p. 71-90, July 2003.

SNIESKO, S. F. Diseases of fish and their control in the U.S. In: The two lakes fifth fishery management training course report. London, Jansen. p. 55-66, 1973.

SOARES, J. B.; CASSIMIRO, A. R. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. **Microbiologia básica**. 2. ed. Fortaleza: EUFC. 180 p. 1991.

SOULAP, E. **Nuevas alternativas de cultivos acuícolas**. Guayaquil: Ed. Ener Soulap, 442 p. 1999.

SOUZA FILHO, J.; COSTA, S. W. da; TUTIDA, L. M.; FRIGO, T. B.; HERZOG, D. **Custo de produção do camarão marinho**. Ed. Rev. Florianópolis: Instituto Cepa/SC/Epagri, 24 p., 2003. (Cadernos de Indicadores Agrícolas, 1).

STARKS, A. M.; SCHOEB, T. R.; TAMPLIN, M. L.; PARVEEN, S.; DOYLE, T. J.; BOMEISL, P. E.; ESCUDERO, G. M.; GULIG, P. A. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 10, p. 5785-5793, Oct. 2000.

SU, Y. C.; LIU, C. C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 549-558, Sept. 2007.

SUNG, H. H.; LI, H. C.; TSAI, F. M.; TING, Y. Y.; CHAO, W. L. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 236, n. 2, p. 261-271, Apr. 1999.

SUNG, H. H.; HSU, S. F.; CHEN, C. K.; TING, Y. Y.; CHAO, W. L. Relations between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 192, n. 2, p. 101-110, Jan. 2001.

TAVARES, M. Espécies exóticas aquáticas e saúde ambiental. **Saúde Ambiental e Trabalho**, v. 27, n. 4, p. 530-536, out./dez. 2003.

TAVARES, M.; MENDONÇA JR, J. B. *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Brachyura: Portunidae), eighth nonindigenous marine decapod recorded from Brazil. **Crustaceana Research**, Leiden, v. 25, n. 5, p. 151-157, 1996.

THEOPOLD, U.; SCHMIDT, K.; DUSHAY, M. S. Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. **Trends in Immunology**, London, v. 25, n. 6, p. 289-294, June 2004.

THOMPSON, J. A.; FRELIER, P. F.; LAWRENCE, A. L. Monitoring health and environment in U.S. shrimps farms. In: **Anais...** International Congress of Animal Hygiene, 8. p. 121-124, 1994.

THOMPSON, J. R.; 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**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4103-4110, July 2004.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. São Paulo: Roca, 556 p. 2004.

VALENTI, W. C. **Carcinicultura de água doce: tecnologia para produção de camarão**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. p. 386. 1998.

VAN DE BRAAK, C. B. T. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. 168 f. 2002. Thesis (PhD in Biology) - Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, The Netherlands, 2002.

VAN DE BRAAK, C. B. T.; BOTTERBLOM, M. H. A.; TAVERNE, N.; VAN MUISWINKEL, W. B.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VAN DER KNAAP, W. P. W. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 13, n. 3, p. 253-272, Mar. 2002.

VANDENBERGHE, J. ; LI, Y.; VERDONCK, L.; LI, J.; SORGELLOOS, P.; XU, H. S.; SWINGS, J. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae and post larvae in Chinese shrimp hatcheries. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 121-132, Nov. 1998.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, n. 4, p. 299-308, 2003.

VIEIRA, C. B. **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.** 77 f. 2008. Dissertação. (Mestrado em Ciências Marinhas Tropical) – Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

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**, Fortaleza, v. 33, p. 107-112, 2000.

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**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 179-182, July/Aug. 2004.

VIEIRA, S. Bioestatística: tópicos avançados. Rio de Janeiro: Campus, 2003. p 212

VILLALÓN, J. R. **Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp.** National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Department of Commerce. 104 p. Apr. 1991.

VINATEA, A. L. **Fundamentos de Aqüicultura.** Florianópolis: Editora da UFSC. 349 p. 2004.

WEST, P. A.; COLWELL, R. R. In: COLWELL, R. R.; HATEN, M. G. (eds.). **Vibrios in the environment.** John Wiley Press. p. 285–363. 1983.

XIE, Z. Y.; HU, C. Q.; CHEN, C.; ZHANG, L. P.; REN, C. H. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 202–207, June 2005.

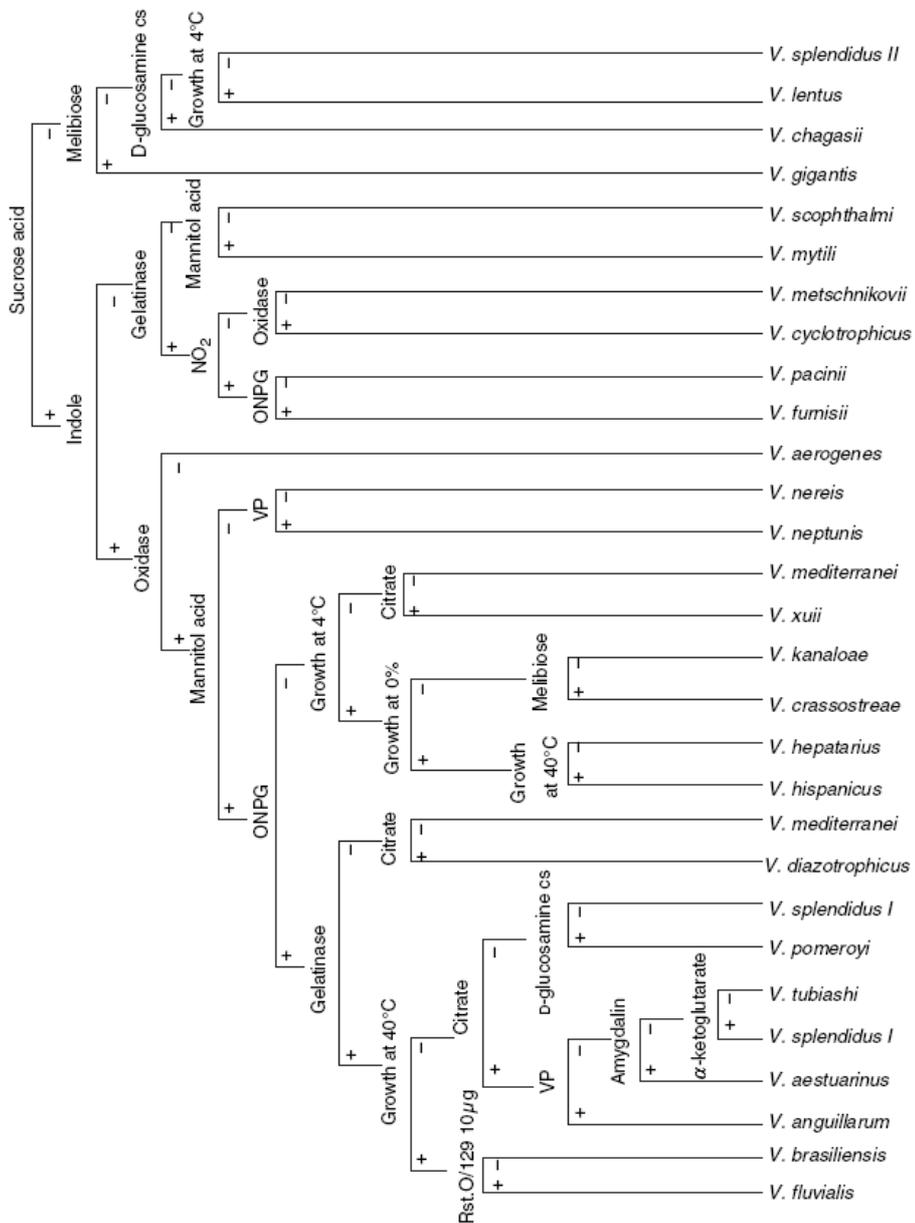
ZHANG, X. H.; AUSTIN, B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 93-102, Mar. 2000.

8. ANEXO

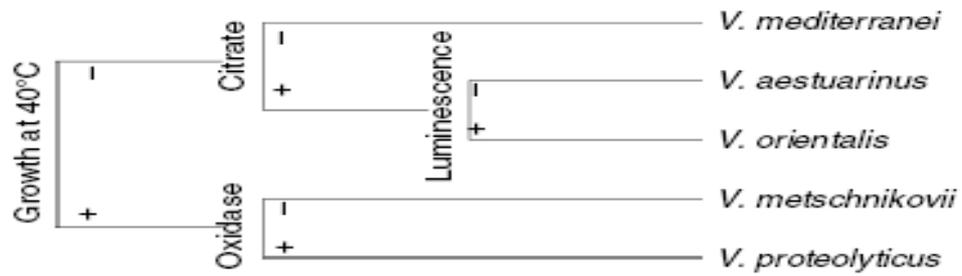
ANEXO A - Chave de identificação das espécies de *Vibrio* spp.
(NOGUEROLA; BLANCH, 2008)



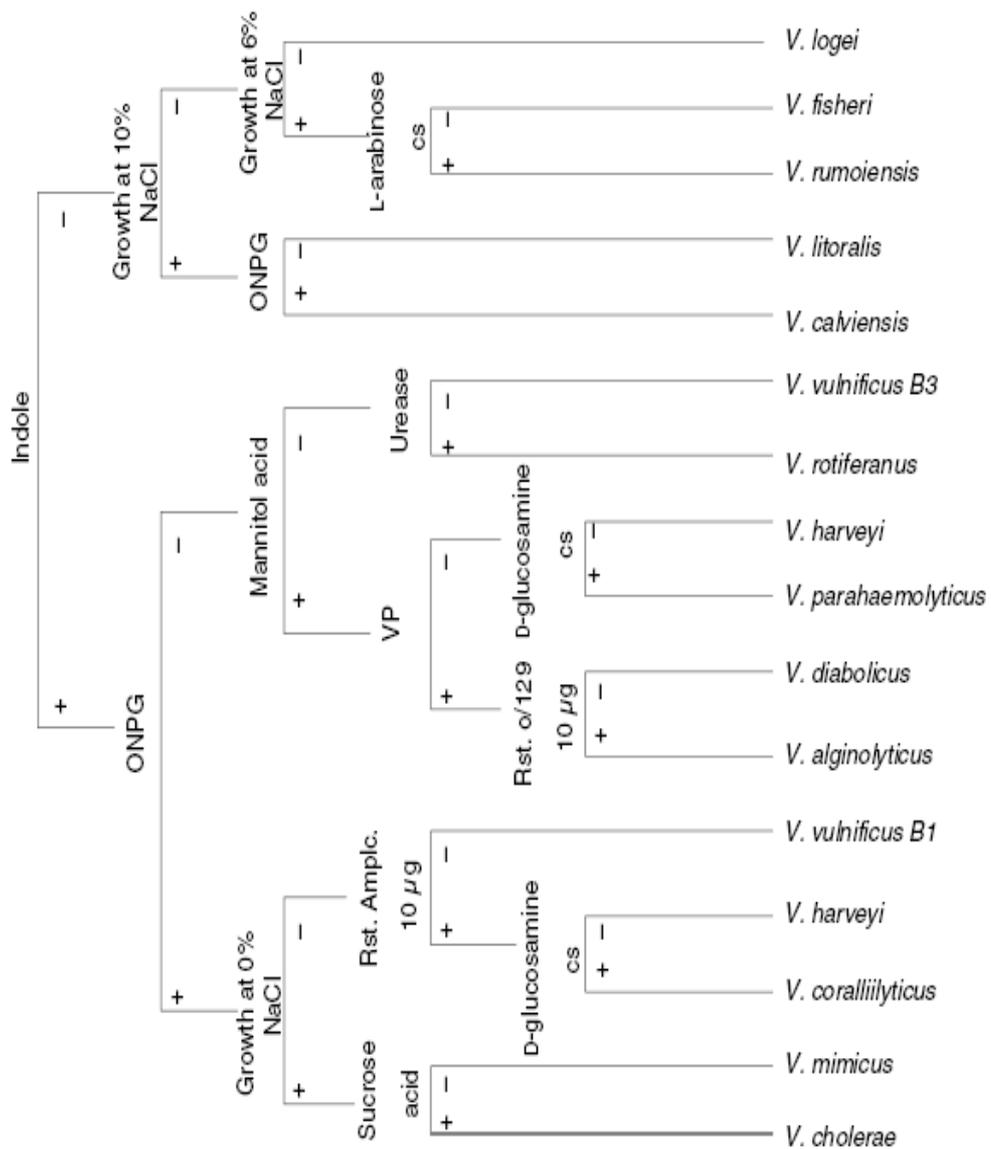
Chave 1: A+/L+/O+



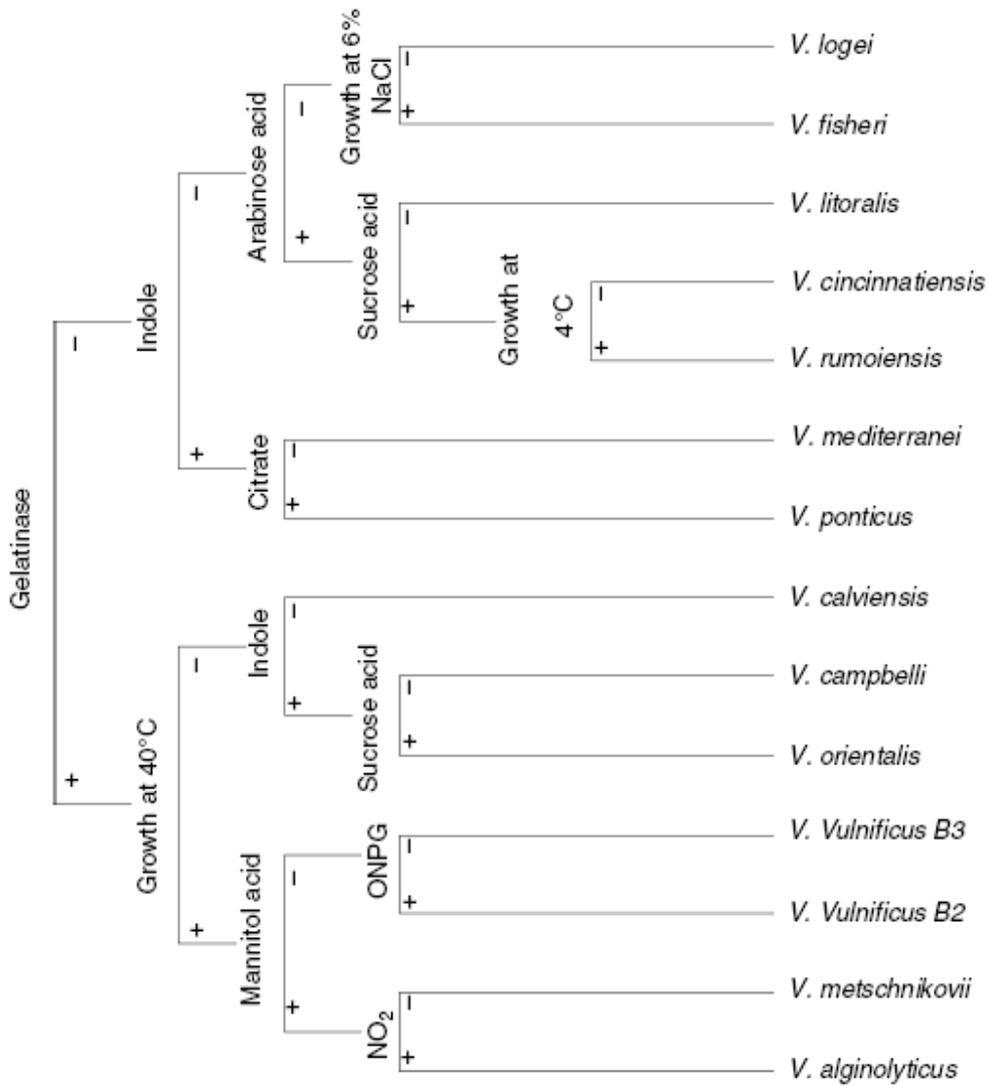
Chave 2: A+/L -/O -



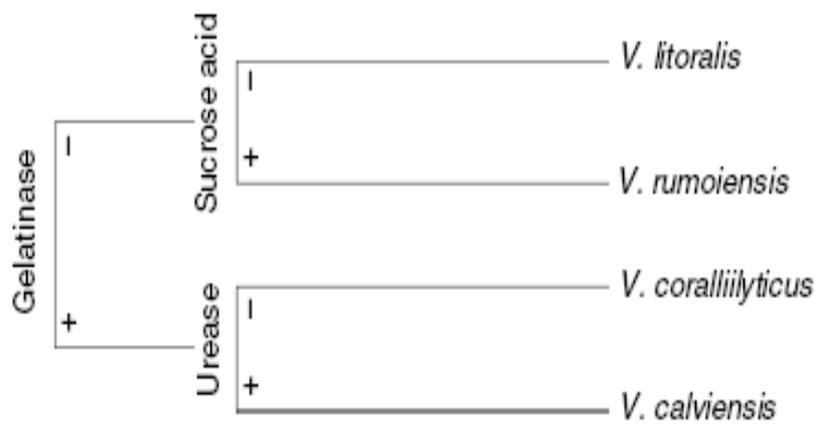
Chave 3: A+/L+/O-



Chave 4: A- /L+/O+



Chave 5: A - /L+/O -



Chave 6: A -/L - /O+

