

Avaliação de bacterina e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção experimental por *Vibrio harveyi* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*

Celso Carlos BUGLIONE¹
 Fabíola PEDROTTI¹
 Felipe do Nascimento
 VIEIRA¹
 Walter Quadros SEIFERT¹
 José Luiz MOURIÑO¹
 Maurício Laterça MARTINS²

1 - Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC
 2 - Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura do Departamento de Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

Correspondência para:

Laboratório de Camarões Marinhos –
 Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC,
 Beco dos Coroas, (fundos) -
 CEP: 88062-601 Florianópolis, SC.
 E-mail: mourino@lcm.ufsc.br.

Recebido para publicação: 18/04/2007
 Aprovado para publicação: 07/03/2008

Resumo

Objetivou-se averiguar o efeito da bactéria *Lactobacillus plantarum* e células inativas das bactérias *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida* e *Pasteurella multocida* na sobrevivência larval de *Litopenaeus vannamei*, no teste de estresse e infecção experimental com *Vibrio harveyi*. Foram utilizados tanques cônicos de 30 L, povoados com 400 larvas cada, no estágio de pós-larva cinco. Tratamentos em triplicatas foram consistidos de: 1: ração comercial (controle), 2: ração comercial + bacterina via oral na artemia, 3: ração comercial + bacterina via imersão e 4: ração comercial com inóculo de *Lactobacillus plantarum*. A aplicação da bacterina ocorreu seis horas antes da infecção e do teste de estresse; enquanto o *Lactobacillus plantarum* foi administrado por 15 dias antes dos desafios. As pós-larvas do tratamento 4 (ração suplementada com *L. plantarum*) obtiveram maior índice de sobrevivência no teste de estresse ($87,86 \pm 2,35\%$), seguido dos tratamentos 2 e 3 (bacterina via imersão e oral) com $81,54 \pm 1,50\%$ e $80,16 \pm 2,15\%$ respectivamente, superiores ao índice do controle ($72,63 \pm 3,34\%$). Já no desafio com *V. harveyi*, os animais do grupo tratado com a adição de bacterina via imersão apresentaram maior sobrevivência ($79,60 \pm 7,12\%$). As pós-larvas dos tratamentos com bacterina via oral na artêmia e alimentadas com o probiótico *L. plantarum*, apresentaram sobrevivências de $65,60 \pm 5,18\%$ e $69,60 \pm 10,43\%$, respectivamente, sendo superiores ao controle ($56,4 \pm 5,58\%$), quando desafiados com *V. harveyi*. Os resultados demonstram que o uso de ração com *L. plantarum* e bacterina aumentam a sobrevivência das pós-larvas de *L. vannamei* frente aos testes de estresse e infecções experimentais com *V. harveyi*.

Palavras-chaves:

Camarão marinho.
 Vibriose.
 Probiótico.
 Bactérias.

Introdução

Considerando a indústria aquícola no mundo e no Brasil, as enfermidades em organismos aquáticos, representam um dos principais fatores de risco.¹ Em geral, o cultivo de camarões na América tem sofrido baixas devido às enfermidades de origem viral e bacteriana.

As doenças bacterianas são causadas principalmente por bactérias do gênero

Vibrio.² A septicemia causada por vibrios e as infecções internas localizadas são acompanhadas por diferentes sinais clínicos como opacidade da musculatura abdominal, anorexia e cromatóforos expandidos.³ Sendo que algumas espécies de *Vibrio*, como o *Vibrio parahaemolyticus*, são também patógenos humanos, causando distúrbios entéricos.⁴

Os crustáceos são providos apenas de um sistema imune inato ou natural,

diferentemente dos vertebrados, que possuem além deste, um sistema adaptativo.⁵ Diversos autores têm demonstrado que o fornecimento de substâncias imunoestimulantes aos camarões, pode melhorar os seus índices imunológicos, resultando em uma maior resistência à infecção por patógenos.^{6,7,8}

Os imunoestimulantes que recebem a maior atenção pelo sucesso em promover a sobrevivência dos crustáceos à exposição experimental aos microrganismos infecciosos compreendem cinco tipos principais: (i) bactérias vivas; (ii) bactérias inativadas (bacterinas ou antígenos bacterianos); (iii) glicanos; (iv) peptidoglicanos; e (v) lipopolissacarídeos (LPS).^{9,10}

Outro método que vem ganhando aceitação é a utilização de bactérias probióticas.¹¹ Diversos autores vêm demonstrando os probióticos podem melhorar o crescimento dos camarões¹², o sistema imune^{13,14} e a resistência à infecções por patógenos¹⁵. O fornecimento de alimentação suplementada com probióticos lácticos resulta em uma melhoria na resistência dos camarões à infecção por *Vibrio alginolyticus*.¹⁶

Objetivou-se determinar a sobrevivência de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* tratadas com probiótico e bacterina nos testes de estresse e infecção experimental com *Vibrio harveyi*.

Material e Método

Foram utilizados os isolados bacterianos de *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida* e *Pasteurella multocida*, para a elaboração da bacterina, provenientes de surtos em larviculturas de *Litopenaeus vannamei* e identificadas com o Kit de identificação API 20E (BiomérieuxTM). Todas as cepas foram incluídas na mesma proporção dentro do inóculo utilizado.

Os isolados bacterianos foram cultivados separadamente em tubos de ensaio de 10 mL contendo caldo Brain and Heart Infusion (BHI, Difco) por 24 h sob agitação contínua. Posteriormente, os

isolados bacterianos foram diluídos dez vezes serialmente (fator 10) e as diluições foram semeadas em meio de cultura agar marino (Difco). Após 24 h de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram mensuradas. Posteriormente, foi adicionado formalina (5%) à cultura, que foi novamente incubada sob agitação a 30 °C por 24 h. As culturas bacterianas foram então centrifugadas a 4.000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante (contendo a formalina) descartado e o *pellet* ressuspenso em um volume de solução salina estéril a 1,5% (SSE) necessário para resultar na concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL de bactérias. A suspensão bacteriana em SSE foi então semeada em placa de petri contendo meio de cultura Agar Marino e incubada a 30 °C por 24 h para verificar a segurança da bacterina.

Utilizou-se a cepa de bactéria ácido láctica, *Lactobacillus plantarum* (CPQBA007-07 DRM1), como probiótica, isolada de intestino de camarões adultos de *Litopenaeus vannamei* por Vieira et al.¹⁷, que demonstraram grande capacidade de inibição *in vitro* de *Vibrio harveyi*. O probiótico foi adicionado à ração na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de ração e incubado durante 24h à temperatura de 30 °C em anaerobiose. Posteriormente a ração foi transferida para uma estufa de secagem, onde permaneceu por 24 h a temperatura de 35 °C. Para confirmação da presença das bactérias ácido lácticas, a ração foi semeada em Agar MRS (Oxoid) modificado.¹⁶

O inóculo de *Vibrio harveyi* U.A. 2343 foi preparado em caldo BHI sob agitação contínua (190 x g) a 30 °C durante 24h. Posteriormente, a suspensão bacteriana de *V. harveyi* foi centrifugada (1000 x g), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em SSE. Então, o inóculo de *V. harveyi* foi diluído dez vezes serialmente (fator 10) e as diluições foram semeadas em meio de cultura agar marino (Difco) e incubadas a 30 °C. Após 24 h de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram mensuradas. A concentração final do inóculo foi de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL.

Para realização dos experimentos foram utilizados tanques com formato cilindro cônico com capacidade de 30L, com aeração contínua e a temperatura foi mantida em 29 ± 2 °C. Cada tanque foi povoado na com 400 pós-larvas (PL) no estágio cinco, na densidade de 13,3 PL/L, sendo testados quatro tratamentos com três repetições cada.

Os tratamentos avaliados foram: 1) controle, 2) aplicação de bacterina via imersão na água dos tanques das artêmias por cerca de 30 minutos e fornecidas as PL também seis horas antes dos desafios, 3) aplicação de bacterina via imersão diretamente na água dos tanques seis horas antes dos desafios e 4) alimentação das PL com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* diariamente por 15 dias.

Quando as pós-larvas alcançaram o estágio de PL-20 foram concentradas em peneira de 500 micras e em seguida, 150 PL de cada repetição foram distribuídas em recipientes contendo 1L de água marinha autoclavada, com aeração constante. As PL permaneceram nos recipientes durante seis horas antes dos testes de estresse por salinidade e de desafio por infecção experimental.

Para avaliação das resistências das PL após a administração dos probióticos e bacterinas, foi aplicado o teste de estresse por salinidade após seis horas da aplicação da bacterina, sendo 100 PL de cada tratamento separadas e colocadas diretamente em água doce com salinidade

0ppm por uma hora. Em seguida foram novamente colocadas em água com salinidade de 34ppm onde permaneceram por mais uma hora para avaliação de sobrevivência.

Para avaliação do efeito dos tratamentos, 50 pós-larvas de cada tratamento foram repassadas para recipientes de um litro contendo água do mar estéril e adicionada de 1 mL do inóculo de *Vibrio harveyi* suspenso em SSE na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. A sobrevivência das pós-larvas foi avaliada após 72 horas da infecção experimental.

Utilizou-se a análise de variância ($\alpha < 0,05$) para detectar diferenças entre os tratamentos, aplicando-se o teste Tukey Para comparação das médias ($\alpha < 0,05$).

Resultados

As PL que demonstraram o melhor desempenho ao teste de estresse foram do tratamento alimentado com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* ($87,86 \pm 2,35\%$). As PL dos tratamentos com bacterina por imersão e via oral pela artêmia quando submetidas ao teste de estresse, apresentaram sobrevivências de $81,54 \pm 1,50\%$; $80,16 \pm 2,15\%$ respectivamente. As sobrevivências das PL tratadas com probióticos e bacterina mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação às do grupo controle, que apresentaram sobrevivência média de $72,64 \pm 3,34\%$. Não foram observadas diferenças entre a rota de aplicação da bacterina (Tabela 1).

Tabela 1 - Sobrevivência das pós-larvas de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) tratados com bacterina e *Lactobacillus plantarum* (probiótico) após os desafios com *Vibrio harveyi* e teste de estresse por salinidade. Florianópolis, janeiro de 2007

Tratamentos	Sobrevivência (%)	
	Infecção com <i>V. harveyi</i>	Teste de estresse por salinidade
Probióticos	$69,60 \pm 10,43ab^*$	$87,86 \pm 2,35 a$
Bacterina via imersão	$79,60 \pm 7,12 a$	$81,54 \pm 1,50 ab$
Bacterina via artemia	$65,60 \pm 5,18 ab$	$80,16 \pm 2,15 ab$
Controle	$56,40 \pm 5,58 b$	$72,64 \pm 3,34 c$
CV	3%	14%

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey; valores expressos em média $\pm$ desvio padrão

No desafio de infecção com *V. harveyi* as PL do grupo tratado com a aplicação da bacterina via imersão apresentaram maior sobrevivência que o grupo controle ($79,60 \pm 7,12\%$) ($p < 0,05$). A suplementação de *Lactobacillus plantarum* na ração apresentou uma sobrevivência das pós-larvas de $69,60 \pm 10,43\%$ seguido da aplicação de bacterina via oral na artêmia ($65,60 \pm 5,18\%$) (Tabela 1).

Discussão

Os invertebrados não possuem imunoglobulinas, que são moléculas de reconhecimento de intrusos encontradas em animais superiores. Porém, estas espécies possuem proteínas denominadas de proteínas de reconhecimento padrão (PRP - pattern recognition proteins).¹⁸ Estes PRP podem sinalizar a presença de sinais moleculares específicos de microrganismos, como os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram negativas.¹⁸ Durante as infecções, os LPS podem se ligar aos receptores dos hemócitos granulares diretamente, ou através de proteínas de reconhecimento do plasma, levando à sua ativação, degranulação e liberação de compostos de defesa.⁵ De alguma forma, os LPS das bactérias inativadas quando presentes na água podem ter ativado o reconhecimento “não próprio”, ativando o sistema imunológico de defesa das pós-larvas. Estes processos podem estar relacionados ao aumento da sobrevivência das pós-larvas de camarões tratadas com bacterinas e infectadas com *V. harveyi*.

Muitos autores têm demonstrado que a composição natural da microbiota intestinal de camarões marinhos pode ser modificada pelo fornecimento de bactérias probióticas

diretamente na alimentação¹⁹, podendo esta modificação estimular a resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por bactérias patogênicas¹⁵. Adicionalmente, bactérias lácticas são conhecidas pela produção de compostos extracelulares que estimulam respostas imunes não específicas²⁰ e que inibem o crescimento de *V. harveyi*¹⁷. A melhoria na taxa de sobrevivência dos camarões alimentados ração suplementada com *Lactobacillus plantarum* deve estar associada a estes fatos.

Os resultados obtidos neste experimento remetem a demonstração do potencial da bacterina na prevenção de enfermidades bacterianas, como as vibrioses. O uso de bactérias ácido lácticas também apresentou um potencial profilático, demonstrado pelos bons índices de sobrevivência obtidos no teste de estresse.

Atualmente, como é grande o interesse da indústria camaroneira evitar o uso de antibióticos, principalmente em decorrência das exigências de mercado, o uso de bactérias ácido lácticas e de bacterinas se apresentam com grande potencial na profilaxia de enfermidades em camarões. Entretanto, existe ainda, a necessidade da realização de experimentos a campo para melhorar a determinação de estratégias de sua aplicação.

Conclusão

O uso de ração com *L. plantarum* e bacterina aumentam a sobrevivência das pós-larvas de *L. vannamei* frente aos testes de estresse e infecções experimentais com *V. harveyi*.

Agradecimentos

À Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca/PR (SEAP/PR) pelo suporte financeiro.

Evaluation of bacterin and *Lactobacillus plantarum* front an experimental infection of *Vibrio harveyi* in pos-larvae of *Litopenaeus vannamei*

Abstract

This study aimed to verify the effect of probiotics and inactivated cells of bacterias such as *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida* and

Key words:
Marine shrimp.
Vibriosis.
Probiotic.Bacteria.

Pasteurella multocida in larvae survival of *Litopenaeus vannamei*, in stress test and experimental infection with *Vibrio harveyi*. Conic tanks of 30 L, were stocked with 400 post-larvae stage five. Four experimental treatments with triplicates consisted of: 1: commercial feed (control), 2: commercial feed plus bacterin by oral administration in artemia, 3: commercial feed plus bacterin by immersion administration, 4: commercial feed with *Lactobacillus plantarum* inoculation. Bacterin application was conducted 6h before the infection and stress test, while probiotic administration was for 15 days before challenges. In stress test, post-larvae of treatment 4 (commercial feed supplemented with *Lactobacillus plantarum*) with reached the highest survival rate ($87,86 \pm 2,35\%$) followed by the ones of treatment 3 and 2 (bacterin by immersion and bacterin by oral administration in artemia) with $81,54 \pm 1,50\%$ and $80,16 \pm 2,15\%$, respectively, which were superior to the control treatment ($72,63 \pm 3,34\%$). Next to *V. harveyi* challenge, animals from treatment 3 presented the highest survival rate ($79,60 \pm 7,12\%$) followed by treatments 4 ($69,60 \pm 10,43\%$), 2 ($65,60 \pm 5,18\%$) and control ($56,4 \pm 5,58\%$). All treatments were different from control. The present results demonstrate the possible use of *L. plantarum* and bacterin as promoters in survival rates of *L. vannamei* post-larvae in the stress tests and challenges with *Vibrio harveyi*.

Referências

- 1 GARCIA-ULLOA, M. Aditivos nutricionales: probióticos. **Panorama Acuicola**, v. 8, n. 5, p. 38, 2003.
- 2 RUANGPAN, L.; KITAO, T. Vibrio bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus. **Journal of Fish Diseases**, v. 14, p. 383-388. 1991.
- 3 SONG, Y. L.; CHENG, W.; WANG, C. H. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 24-31, 1993.
- 4 FUENZALIDA, L.; ARMIJO, L.; ZABALA, B.; HERNÁNDEZ, C.; RIOSECO, M. L.; RIQUELME, C.; ESPEJO, R. T. Vibrio parahaemolyticus strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 270-275, 2007.
- 5 BARRACCO, M. A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos, In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2004. p. 49-72.
- 6 WANG, S.; CHEN, J. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. **Fish & Shell Immunology**, v. 19, p. 191-204, 2005.
- 7 HUANG, X. A.; ZHOU, H. A.; ZHANG, H. B. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 750-757, 2006.
- 8 AZADA, I. S. B.; PANIGRAHIA, A. C.; GOPALA, C.; PAULPANDIA, S.; MAHIMAA, C.; RAVICHANDRANA, P. Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. **Aquaculture**, v. 248, p. 227-234, 2005.
- 9 TEUNISSEN, O. S. P.; FABER, R.; BOOMS, G. H. R.; LATSCHA, T.; BOON, J. H. Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (fabricius). **Aquaculture**, v. 164, p. 359-366, 1998.
- 10 ALABI, A. O.; JONES, D. A.; LATCHFORD, J. W. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 178, p. 1-11, 1999.
- 11 GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, p. 259-270, 2000.
- 12 VENCAT, H. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K. Effect of feeding lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 501-507, 2004.
- 13 RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v. 167, p. 301-313, 1998.
- 14 GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, p. 1-14, 2004.
- 15 RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.;



PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v. 191, p. 271-288, 2000.

16 RAMIREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. 2005. 180 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

17 VIEIRA, F. N.; PEDROTTI, F. S.; BUGLIONE, C. C.; MOURIÑO, J. L. P.; BELTRAME, E.; MARTINS, M. L.; RAMIREZ, C.; VINATEA, L. A. Effect of use of acid-lactic probiotic bacterias in the marine shrimp (*Penaeus vannamei*) hatchery survival and microbiology of the water and larvae. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, p. 251-255, 2007.

18 RODRIGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v. 108, p. 1043-1050, 2000.

19 ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M. H.; TAKAMI, G. A.; LOVETT, D. L.; MIRVAGHEFI, A. R.; SHAKOURI, M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516-524, 2006.

20 RINGO, E.; GATESOUPÉ, F. O. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177-203, 1998.