



**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

## **Controle de doenças na aquicultura de camarões usando a Tecnologia do Consórcio Probiótico (TCP)**

### **Sumário**

A produção de aquicultura de camarões na maior parte do mundo é reprimida por doenças, particularmente causadas pelo *Vibrio* luminoso e/ou outros vírus. Antibióticos, que têm sido usados em grandes quantidades, são em muitos casos ineficazes ou resultam no aumento da virulência de organismos patogênicos e mais, são a causa de preocupação por promoverem a transferência de resistência à antibióticos nos patógenos humanos. A Tecnologia do Consórcio Probiótico (TCP) provê uma solução para esses problemas. A composição de espécies microbiais em tanques de piscicultura ou em grandes lagos de aquicultura pode ser alterada com a adição de espécies selecionadas de bactérias para deslocar bactérias normais deletérias. A virulência das espécies de *Vibrio* luminoso podem ser controladas dessa maneira. A abundancia de estirpe de *Vibrio* luminoso decresceu em lagos e tanques em que estirpes probióticas de espécies selecionadas de *Bacillus* foram adicionadas. Uma fazenda nas Filipinas, que havia sido devastada pela doença do *Vibrio* luminoso enquanto usava altas dosagens de antibióticos na alimentação, atingiu taxas de sobrevivência de 80-100% de camarões em todos os lagos tratados com a Tecnologia do Consórcio Probiótico.

### **Introdução**

A FAO da ONU estima que metade da demanda de frutos do mar do mundo vai ser encontrada pela aquicultura em 2020, já que a pesca de captura selvagem são sobre-exploradas e está em declínio. A cultura de camarões é muito difundida no mundo tropical. É uma indústria ajustada para um período de demanda crescente e que atualmente vale em torno de U\$10 bilhões. *Penaeus monodon*, o camarão tigre preto, é a espécie mais cultuada de camarões.

Na maior parte do mundo, no entanto, a indústria de aquicultura de camarões é obstruída por doenças, a maioria devido à bactérias (especialmente o *Vibrio harveyi* luminoso) e vírus. A alta densidade de animais em tanques e lagos de piscicultura conduz à propagação de patógenos e o ambiente aquático com aplicações regulares de alimentação rica em proteínas é ideal para a cultura de bactérias.

Nós sentimos que esses problemas são exacerbados porque a interação de micróbios, animais e o ambiente em intensa escala de produção tem sido considerada primeiramente por uma



**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

perspectiva clínica patológica. Isto é, a doença é tratada, mas não a causa subjacente à ela. Quando bactérias patogênicas ou vírus são detectados, os criadores aplicam componentes antimicrobicos na alimentação e na água. Muitos criadores também usam antibióticos como os profiláticos em grandes quantidades, mesmo quando os patógenos não estão evidentes. Isso levou à um aumento de *Vibrios* e presumidamente de outras bactérias, que desenvolveram resistência à antibióticos e aumentaram os patógenos mais virulentos. Muitos dos patógenos aparentam ter mutado para formas mais virulentas do que eram uma década atrás, e assim até mesmo quando os camarões não estão sob o estresse de águas com má qualidade, eles sucumbem aos ataques dos vírus. Dessa forma, nós sentimos que a incidência de doença tem sido exacerbada pelas ações dos criadores de camarão.

A solução está na área de ecologia microbiana, não no campo da farmacologia, como por exemplo no desenvolvimento de novos antibióticos ou vacinas [5]. Criadores de camarão têm que aprender à viver e à administrar uma comunidade complexa de micróbios. O uso de bactérias benéficas (Probióticos) para deslocar bactérias patogênicas por processos de competição é um melhor remédio do que administrar remédios, e funciona!

A composição de espécies microbianas nos tanques de aquicultura pode ser alterada pela adição de espécies selecionadas para o deslocamento de bactérias comuns deletérias. O sucesso depende somente na definição do processo(s) ecológico(s) que deve ser mudado, os tipos de espécies deletérias que são dominantes e as alternativas desejadas de espécies ou estirpes de bactérias que podem ser adicionadas. A exclusão por competição é um dos processos ecológicos que permite a manipulação da composição de espécies bacterianas na água, sedimento e entranhas dos animais.

## **Antimicrobianos e Patógenos**

*Vibrio spp.*, especialmente o *V. harveyi* luminoso foram implicados como os principais patógenos bacterianos dos camarões [2]. Antibióticos foram usados em tentativas de controlar essas bactérias, mas a sua eficácia é geralmente muito ruim. Nas Filipinas, a doença do *Vibrio* luminoso causou uma grande perda na produção de camarão em 1996, e muitos criadouros pararam de produzir camarões porque a sobrevivência era muito baixa. As espécies de *Vibrio* são resistentes à qualquer antibiótico usado, incluindo o *cloranfenicol*, *furazolidona*, *oxitetraciclina* e *estreptomicina*, e estão mais virulentos do que em anos anteriores.

Esse ano na Tailândia, um criador que estava usando prata coloidal em todos os seus alimentos presenciou um grande aumento na mortalidade dos *vibrios*. Isso foi administrado por um período com altas dosagens de *norfloxacin*a em todos os alimentos. No entanto, quando este procedimento acabou, todos os camarões morreram dentro de 2 dias.

Claramente, uma estirpe altamente virulenta de *Vibrio* luminoso foi desenvolvida em resposta ao uso de antibióticos e de prata.

A clorina é amplamente usada em incubadoras e tanques, porém o seu uso estimula o desenvolvimento de múltiplas resistências genéticas à antibióticos nas bactérias [8]. Alguns criadores na Tailândia reportaram que quando a clorina é usada em seus tanques para matar zooplânctons antes da lotação de camarões, houve um rápido aumento do número de *Vibrio harveyi* após a clorina ser removida. Isso é esperado porque *Vibrios* marinhos têm taxas altas de crescimento rápido e o tratamento de clorina vai diminuir o número de competidores por nutrientes e matar algas, aumentando as fontes de alimentação. É possível, então, que os *Vibrios* sobreviventes após o tratamento de clorina não só são mais resistentes aos antibióticos, como também são patogênicos. Assim, os problemas são exacerbados pelo uso de componentes antimicrobianos.

Se os antibióticos ou desinfetantes são usados para matar bactérias, algumas sobreviverão, seja as de estirpe patogênica ou outras, porque eles carregam genes com resistência. Essas, então, crescerão rapidamente porque os seus competidores são removidos. Qualquer patogênico virulento que reentrar o lago ou tanque de incubação, talvez pelos biofilmes nos canos d'água ou nas entranhas dos animais, podem trocar genes com as bactérias resistentes e sobreviver à maiores doses de antibióticos. Assim, as estirpes de patogênicos resistentes à antibióticos evoluem mais rapidamente.

A transferência de resistência para os patógenos humanos e bactérias intestinais são uma grande preocupação. Tal transferência possivelmente ocorre fácil e frequentemente, como discutido por Salyers [10]. Plasmídeos resistentes codificados para terem genes resistentes a antibióticos foram transferidos entre bactérias Gram-negativas patogênicas e não-patogênicas em diferentes ambientes, incluindo água do mar. Na presença de concentrações de tetraciclina que não eram altas suficiente para matar as bactérias, as taxas de transferência genética entre *Vibrio cholerae* e *Aeromonas salmonicida* aumentou 100 vezes [4].

Esse trabalho levanta questões relacionadas tanto com o uso de antibióticos na aquicultura, como também sobre o uso de bactérias intimamente relacionadas à espécies patogênicas como probiótico. Não somente a resistência genética antimicrobiana, mas também genes de virulência podem ser transferidos por R plasmídeos e transposons. Como os R plasmídeos podem transferir genes entre diferentes bactérias no grupo Gram-negativo, seria potencialmente perigoso usar *Vibrios* ou *Pseudomonas*, por exemplo, como probióticos.

Na Ásia, criadores de camarão usam antibióticos em grandes quantidades. Armazéns que suportam a indústria em todos os grandes centros vendem uma variedade de antibióticos em containers de 500g ou mais em tamanho. Os antibióticos usados atualmente incluem fluoroquinolonas, especialmente norfloxacin e enrofloxacin, furazolidona, ácido oxolínico, oxitetraciclina, trimetoprina e sulfadiazina. É difícil descobrir a quantidade de uso antibiótico



**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

na indústria, mas é possível fazer uma estimativa pelo uso de comida e produção. Em 1994, a Tailândia produziu em torno de 250.000 toneladas (um quarto da produção mundial) de camarões de criadouro, o que consumiu em torno de 500.000-600.000 toneladas de alimentos. Com os problemas de doenças, a produção de camarão no ano passado reduziu 150.000 toneladas. Para cada parcela da escala de produção semi-intensiva a intensiva, os criadores usaram 5-10g de antibióticos por kg de alimentos pelo menos uma vez ao dia em intervalos semanais; alguns usaram por períodos mais extensivos.

Assim, antibióticos seriam usados em torno de 10% dos alimentos. É possível, então, que o uso de antibióticos na produção de camarões da Tailândia em 1994 era de 500-600 toneladas, assumindo que todos os criadores fizessem uso – e isso não inclui o uso em incubadoras para produção de alevinos.

Como isso gerará a produção de bactéria com múltipla resistência a antibióticos em efluentes de criadores que posteriormente contaminarão às águas costeiras, o impacto potencial na saúde humana é significativo. O problema é discutido por Austin em 1983 [1] com referência à criadores de peixes, porém a situação tem piorado com o grande aumento de criação de camarões que tem ocorrido desde então.

### **Bactérias Probióticas**

O uso de bactérias benéficas (probióticas) para deslocar patógenos por processos competitivos está sendo usada na indústria animal como uma melhor medida do que administrando antibióticos e agora está ganhando aceitação para o controle de patógenos na aquicultura [3]. O termo “probiótico” é definido como: “um probiótico é uma mono cultura ou cultura mista de microrganismos vivos que, aplicados ao homem ou ao animal, afetam benéficamente o hospedeiro ao melhorar as propriedades da sua microflora indígena” [3]. Nessa discussão, os autores consideraram apenas humanos e animais de criadouros.

Estendendo a definição para a aquicultura, nós sugerimos que isso também se aplica à adição de bactérias naturais e vivas a tanques e lagos em que os animais vivem, porque essas bactérias modificam a composição bacteriana da água e do sedimento. A saúde dos animais é melhorada pela remoção ou diminuição da densidade populacional de patógenos e pela melhoria da qualidade da água a partir da rápida degradação da matéria orgânica desperdiçada.

Diferentemente de animais terrestres, os animais aquáticos criados são cercados por um meio que apoia patógenos oportunistas independentemente do animal hospedeiro, e assim, os patógenos podem alcançar alta abundância sobre o animal. *Vibrio* cresce apenas às algas e podem alcançar alta densidade populacional após serem inseridos junto com elas, então



**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

são excretados com algas lisadas em pastilhas fecais por zooplânctons [7]. Nos lagos de aquicultura, onde a densidade populacional de animais e populações de algas é alta, os números de *Vibrio* também são altos comparado ao mar aberto. O início da doença em camarões devido à exposição a altos números de *Vibrio*, especialmente quando a patogenicidade aumentou pelo excesso de compostos antimicrobianos, indicam que uma defesa é necessária.

A composição de espécies de uma comunidade microbiana, como a de um lago, será determinada parcialmente pelos fenômenos estocásticos que são possíveis e parcialmente pela determinação de fatores previsíveis que permitem o aumento de uma espécie e a divisão mais rápida do que outras, e assim domina numericamente. A possibilidade é favorável de que os organismos que estão no lugar certo, na hora certa, responderão ao aumento de nutrientes, como por exemplo, da lise de células de algas ou da decomposição de palhetas de alimentos que caem ao redor deles. O criador pode manipular a composição de espécies através da sementeira de números de estirpes desejáveis de algas e bactérias; em outras palavras, dará uma “mão amiga” à oportunidade.

A competição exclusiva é um dos processos ecológicos que podem ser manipulados para modificar a composição de espécies do solo, da água ou de outros ambientes microbiais. Pequenas mudanças nos fatores que afetam as taxas de crescimento e mortalidade levarão à mudanças na dominância de espécies. Nós ainda estamos muito longe de saber todos os fatores que controlam as taxas de crescimento de espécies particulares. A composição de espécies completa em ambientes naturais é altamente desconhecida, mas o suficiente é sabido para argumentar que se é possível alterar a composição de espécies fazendo uso do processo de exclusão competitiva [11]. Assim, bactérias podem competir pela segregação de composição antimicrobica que não necessariamente matará a competição, mas aumentará as taxas de mortalidade a níveis suficientes para induzir um equilíbrio na utilização de recursos. Por exemplo, se uma estirpe de *Bacillus* fosse produzir um antibiótico que inibisse o *Vibrio*, então a mortalidade do *Vibrio* iria diminuir, mudando a dominância para o *Bacillus*, mesmo que o antibiótico não fosse produzido em concentrações altas suficiente para matar todas ou a maioria das células *Vibrio* diretamente.

A ecologia microbiana e biotecnologias foram avançadas na última década, ao ponto de que os produtos comerciais e tecnologias são oferecidos para tratar grandes áreas de água e terra para aumentar a densidade populacional de espécies particulares microbianas ou de atividades bioquímicas. A prática de biorremediação (ou bioaugmentação) é aplicada em muitas áreas, mas o sucesso varia, dependendo na natureza dos produtos usados e na informação técnica disponível ao usuário final. As bactérias que são adicionadas precisam ser selecionadas para funções específicas que são submissas à biorremediação, adicionadas em altas densidades populacionais e dentro das condições ambientais certas para que os resultados desejados sejam alcançados. A bioaugmentação e o uso de probióticos são medidas de administração significantes para a aquicultura, mas a sua eficácia depende do



**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

entendimento da natureza de competição entre espécies particulares ou estirpes de bactérias. Eles se apoiam nos mesmos conceitos que são usados com sucesso para a biorremediação de solo e uso de probióticos na indústria animal.

Probióticos como o *Bacillus* gram-positivo oferecem uma alternativa para a terapia de antibióticos para a aquicultura sustentável. As espécies de *Bacillus* são facilmente encontradas em sedimentos marinhos e, então, são naturalmente ingeridas pelos animais como os camarões que se alimentam destes sedimentos.

Uma vantagem de usar as espécies de *Bacillus* é que elas são improváveis de usar genes para resistência de antibióticos ou virulência dos *Vibrios* ou bactérias gram-negativas. Existem barreiras nos níveis de transcrição e tradução para a expressão de genes de plasmídeos, fago e DNA cromossomal de *E. coli* em *B. Subtilis* [9].

## **Aplicações Probióticas na aquicultura**

A composição de espécies de bactérias nos lagos de camarões, que são corpos d'água de pelo menos 1 hectare de tamanho, tanques de incubação e tripas de camarão podem ser facilmente modificadas e resultar em uma melhora na produção de camarão. Em particular, *Vibrio* luminoso pode ser controlado dessa maneira. Para o nosso conhecimento, não há muitos estudos rigorosos feitos sobre as populações de *Vibrio* luminoso nos criadouros de camarão, em relação ao uso de antibiótico ou probiótico. Assim, os dados aos quais nos referimos são dados como exemplos do que foi observado, mas as conclusões precisam ser substantiadas.

Como exemplo está o criadouro Viveros, em que as perdas de *Vibrio* luminosos foram catastróficas, mesmo com os antibióticos usados na alimentação e proveram proteção por um certo período de tempo. A abundância de *Vibrio* luminoso nas águas dos lagos da região eram altas, com taxas de 103 a 104 por ml dentro de 2-3 semanas de enchimento e fertilização dos lagos. No entanto, quando a bactéria probiótica foi usada, nenhuma doença foi experienciada e as taxas de sobrevivência foram muito altas (80-100%), mesmo na presença de espécies de *Vibrio* luminosos (Tabelas 1,2) [6].

Tabela 1. A produção de camarões nos criadouros das Filipinas, com tecnologia probiótica, comparado com o controle com antibióticos [dados de outros lagos controle que colapsaram depois de 30-60 dias não são mostrados]. Lagos foram coletados em Dezembro 1996/Janeiro 1997. Todos os camarões morreram durante a noite no lago 6 de viroses, o que foi uma perda considerável numa cultura de 120 dias.

Tabela 2. Segunda colheita do criadouro (abastecido Abril 1997, coletado Setembro) em 5 dos lagos referidos na Tabela 1.



**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

Em vários lagos nas Filipinas, os números de *Vibrio* luminoso no hepatopâncreas dos camarões reduziu para cerca de  $1 \times 10^4$  por tripa quando antibióticos foram usados nos alimentos, e para zero quando os probióticos foram aplicados aos lagos (Figura 1). A flora da tripa do camarão foi frequentemente dominada pelas espécies de *Vibrio* que tinham sacarose negativa (verde no ágar TCBS) e luminoso na presença de tratamento de antibiótico, enquanto a estirpe de sacarose positiva (colônias amarelas) foram geralmente mais abundantes ou igualmente abundantes quando os probióticos foram usados (Figura 1). Muitos criadouros agora perceberam que eles não podem resolver as doenças virais usando antibióticos.

Figura 1. Total e *Vibrio* luminoso na tripa-central (hepatopancreas) de camarões nas Filipinas.

O *Vibrio* luminoso foi frequentemente abundante na presença de antibióticos: i.e. eles são resistentes e a mortalidade de camarões foi alta, apesar de as vezes eles serem sensíveis, principalmente em 132 dias de cultura, quando os antibióticos são mudados. Depois do dia 160, quando o probiótico foi adicionado diariamente ao lago, *Vibrio* luminoso foi eliminado da tripa.

O *Vibrio* luminoso foi completamente eliminado da coluna de água e dos sedimentos dos lagos na Indonésia quando as estirpes de probióticos selecionados para o efeito inibitório direto foram usadas [11]. Em contraste, os números de *Vibrio* aumentaram de 20 para 200 cfu/ml nos lagos de camarões em que antibióticos foram usados na alimentação. Sobrevivência e, conseqüentemente, a produção foi alta em todos os lagos em que os probióticos foram usados. Esses dados mostram que os problemas de doenças podem ser solucionados ao aplicar a tecnologia de probióticos, o que é uma aplicação de ecologia microbiana. Ela faz uso de mecanismos naturais pelos quais as bactérias competem entre si. Em outras palavras, criadores de camarões que aprendem a criar microrganismos são mais prováveis de atingir uma colheita bem sucedida.

Com a combinação certa de bactéria e aeração, a troca de água pode ser minimizada e a água pode ser reciclada entre colheitas, assim diminuindo os impactos ambientais e a probabilidade de introduzir patógenos. A transferência de resistência de antibióticos para bactérias patogênicas humanas, que é exacerbada pelo abuso de antibióticos na indústria de aquicultura, irá decrescer.



## **Bibliografia**

Austin, B (1993) Environmental issues in the control of bacterial diseases of farmed fish. In: Environment and Aquaculture in Developing Countries. Pullin, RSV. Rosenthal, H, Maclean, JL (eds). ICLARM Conference Proceedings 31. ICLARM, Manila. pp 237-251.

Baticados, MCL, Lavilla-Pitogo, CR, Cruz-Lacierda, ER, de la Pena, LD, Sunaz, NA (1990) Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Org* 9: 133-139.

Havenaar, R, Ten Brink, B, Huis in't Veld, J H J (1992) Selection of strains for probiotic use. In: R. Fuller (ed), *Probiotics: the scientific basis*, Chapman and Hall, London. pp 209-224.

Kruse, H, Sørum, H (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 60: 4015-4021.

Moriarty, DJW (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151: 333-349.

Moriarty, DJW (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.

Moriarty, D.J.W. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: R. Lésel (ed.), *Microbiology in Poecilotherms: Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, B.V. pp. 217- 222.

Murray, G. E., Tobin, R. S., Junkins, B., Kushner, D. J. (1984) Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage related bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 48: 73-77.

Rabinowitz JC, Roberts, M (1986) Translational barriers limiting expression of *E. coli* genes in *Bacillus* and other Gram-positive organisms. In: Levy, S.B, Novick, R.P (eds) *Banbury Report 24: Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression*. Cold Spring Harbour Laboratory pp297-312.

Salyers, A A (1995) *Antibiotic resistance transfer in the mammalian intestinal tract: implications for human health, food safety and biotechnology*. Springer-Verlag, New York. pp 109-136.





**GLOBALSAÚDE**  
BRASIL

Smith, V H (1993) Implications of resource-ratio theory for microbial ecology. *Limnol Oceanogr* 38:239-249.

